



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO EN GENÉTICA Y ECOFISIOLOGÍA**



**COMPRENDIENDO EL NÚCLEO MITÓTICO DE LAS TORTUGAS
TROPICALES, NATIVAS DE TABASCO, MÉXICO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA
Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES**

P R E S E N T A:

M.C.A. JAVIER HERNÁNDEZ GUZMÁN

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. LENIN ARIAS RODRIGUEZ

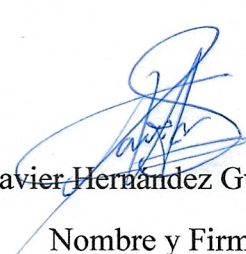
VILLAHERMOSA, TABASCO, A JUNIO DEL 2026

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Villahermosa, el día 09 del mes de marzo del año 2026, el que suscribe Javier Hernández Guzmán alumno del Programa de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales, con número de matrícula 192G26002, adscrito a la División Académica de Ciencias Biológicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor de la Tesis presentada para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales y titulada Comprendiendo el núcleo mitótico de las tortugas tropicales, nativas de Tabasco, México, dirigida por el Dr. Lenin Arias Rodriguez.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita. Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente Villahermosa, Tabasco a 09 de marzo del 2025.



Javier Hernández Guzmán

Nombre y Firma



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN



NOVIEMBRE 26 DE 2025

C. JAVIER HERNÁNDEZ GUZMÁN
PAS. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y
MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES
P R E S E N T E

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. Arts. 74 al 77 del Cap. IV del Reglamento General de Estudios de Posgrado de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales titulado: **"COMPRENDIENDO EL NÚCLEO MITÓTICO DE LAS TORTUGAS TROPICALES, NATIVAS DE TABASCO, MÉXICO"**, asesorado por el Dr. Lenin Arias Rodríguez, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Manuel Pérez de la Cruz, Dr. Magdiel Torres de la Cruz, Dr. Lenin Arias Rodríguez, Dra. Viridiana Peraza Gómez, Dr. Arkady Uscanga Martínez, Dra. Claudia Elena Zenteno Ruiz y Dra. Judith Andrea Rangel Mendoza.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo



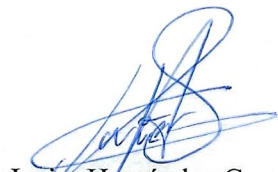
Carta de Cesión de Derechos

Villahermosa, Tabasco a 09 de marzo del 2026.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTORES en la producción, creación y/o realización de la obra denominada **“Comprendiendo el núcleo mitótico de las tortugas tropicales, nativas de Tabasco, México”**.

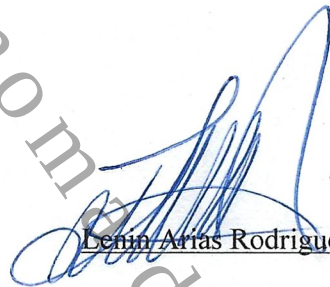
Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



Javier Hernández Guzmán

Alumno



Denin Arias Rodriguez

Director de Tesis



Manuel Pérez de la Cruz

TESTIGOS



Magdiel Torres de la Cruz



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

Villahermosa, Tabasco a 25 de noviembre de 2025

C. JAVIER HERNÁNDEZ GUZMÁN

EGRESADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA
Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES
PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los trabajos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado, el Código Institucional de Ética para la Investigación y con los requerimientos para los posgrados registrados en el SNP de la SECIHTI.

Por este conducto, hago de su conocimiento que, con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, se realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de similitud, el índice de similitud y se emitieron las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: ***Comprendiendo el núcleo mitótico de las tortugas tropicales, nativas de Tabasco, México.***

OBSERVACIONES:

1. **El índice de similitud obtenido fue de 09%**, el cual se ubica dentro del estándar de tolerancia de acuerdo a las Políticas y Lineamientos para el uso y manejo del Software Antiplagio de la UJAT. Se demuestra el nivel de originalidad del documento y de la investigación.
2. Aunque el reporte de similitud obtenido indica coincidencias con cuatro fuentes de consulta, una de éstas se refiere a párrafos correspondientes con el artículo publicado por el sustentante en revistas científicas. Lo anterior, no demerita el documento de tesis, pues dichas coincidencias corresponden con una publicación de autoría del sustentante y de su director de tesis. Además, se detectaron coincidencias menores al 1% con elementos de los métodos, claves taxonómicas y normas. Por lo que se confirma la originalidad de la investigación.



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



2025
AÑO DE LA
Mujer
Indígena

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

3. **Se adjunta el reporte de similitud de la tesis** obtenido a través de la herramienta Turnitin iThenticate.
4. Finalmente, se le solicita al C. Javier Hernández Guzmán, integrar en la versión final de tesis, este oficio y el reporte de similitud con el porcentaje emitido por Turnitin iThenticate de acuerdo con lo señalado en los Lineamientos institucionales para la elaboración de tesis de posgrado.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR

C.C.P. Dr. Lenin Arias Rodríguez. Director de tesis
Archivo

Javier Hernández Guzmán

Comprendiendo el núcleo mitótico de las tortugas tropicales, nativas de Tabasco, México

 Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:533004973

Fecha de entrega

25 nov 2025, 1:27 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

25 nov 2025, 1:48 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

Tesis de Doctorado 2025 Javier-1.pdf

Tamaño del archivo

1.9 MB

142 páginas

44.577 palabras

232.498 caracteres

9% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Coincidencias menores (menos de 16 palabras)

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
36 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.
-  **Texto oculto**
18 caracteres sospechosos en N.º de páginas
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Fuentes principales

9%	 Fuentes de Internet
0%	 Publicaciones
0%	 Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	Internet	www.scielo.org.mx	9%
2	Internet	archive.org	<1%
3	Internet	www.thefreelibrary.com	<1%
4	Internet	repositorio.unicach.mx	<1%
5	Internet	inacol.edu.mx	<1%

CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1.0 Capítulo I: Contexto del estudio en las tortugas tropicales, nativas de Tabasco, México.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Marco teórico.....	4
1.2.1 Taxonomía de las tortugas dulceacuícolas de Tabasco.....	5
1.2.2 Claves de identificación de especies de tortugas dulceacuícolas de Tabasco.....	7
1.2.3 Familia Kinosternidae.....	7
1.2.4 Familia Geoemydidae.....	10
1.2.5 Familia Dermatemydidae.....	10
1.2.6 Familia Chelydridae.....	10
1.2.7 Familia Emydidae.....	12
1.3 Justificación.....	13
1.4 Pregunta de investigación.....	14
1.5 Hipótesis.....	14
1.6 Objetivos.....	15
1.6.1 Objetivo general.....	15
1.6.2 Objetivos específicos.....	15
1.7 Metodología.....	15
1.7.1 Área de estudio y Recolecta.....	15
1.7.2 Desarrollo de una nueva técnica hematológica económica para tortugas dulceacuícolas.....	16
1.7.3 Tamaño del genoma por análisis nuclear en microscopía y citometría.....	16
1.7.4 Procedimiento de cultivo “ <i>in vitro</i> ”.....	16
1.7.5 Elaboración de cariotipos y análisis estadístico.....	17
1.8 Cronograma de actividades.....	18
1.9 Referencias citadas.....	19
2.0 Capítulo II: Técnica citológica novedosa para el estudio de las células sanguíneas en las tortugas tropicales <i>Trachemys venusta venusta</i> , <i>Staurotypus triporcatus</i> y <i>Rhinoclemmys areolata</i>	25
2.1 Introducción.....	28
2.2 Materiales y Métodos.....	30
2.2.1 Área de estudio, recolecta y marcaje.....	30
2.2.2 Extracción y extendido celular.....	30
2.2.3 Fijado post-frotis (Fase experimental I).....	31
2.2.4 Tinción post-frotis (Fase experimental II).....	31
2.2.5 Microscopía óptica y criterios de la calidad celular.....	34
2.2.6 Análisis de datos y estadísticos.....	34
2.3 Resultados.....	35
2.3.1. Fijado post-frotis o Fase experimental I.....	35
2.3.2. Tinción post-frotis con Giemsa madre y Giemsa 10 % (Fase experimental II).....	39
2.4 Discusión.....	44
2.5 Referencias.....	47

3.0 Capítulo III: Estudio del contenido de ADN y el tamaño del genoma en nueve especies de tortugas dulceacuícolas tropicales.....	53
3.1 Introducción.....	56
3.2 Materiales y Métodos.....	57
3.2.1 Área de estudio y Recolecta.....	57
3.2.2 Muestra sanguínea, fijado y tinción.....	58
3.2.3 Elaboración de muestras por microscopía electrónica de barrido (MEB).....	58
3.2.4 Microscopía óptica y biometría nuclear.....	59
3.2.5 Tamaño del genoma por análisis nuclear en microscopía y citometría.....	59
3.2.6 Análisis estadístico.....	60
3.3 Resultados.....	61
3.3.1. Contenido de ADN triploide, tetraploide aneuploide.....	62
3.4 Discusión.....	64
3.4.1. Familia Kinosternidae.....	64
3.4.2. Familia Chelydridae.....	68
3.4.3. Familia Dermatemydidae.....	69
3.4.4. Familia Emydidae.....	69
3.4.5. Familia Geoemydidae.....	71
3.5 Referencias.....	73
4.0 Capítulo IV: Estandarización de un protocolo de cultivo “in vitro” de linfocitos en las tortugas dulceacuícolas <i>Kinosternon leucostomum leucostomum</i>, <i>K. acutum</i> y <i>K. scorpioides cruentatum</i>.....	84
4.1 Introducción.....	86
4.2 Materiales y Métodos.....	87
4.2.1 Área de estudio y recolecta de especímenes.....	87
4.2.2 Procedimiento de cultivo <i>in vitro</i>	88
4.2.3 Microscopía óptica y conteo celular.....	90
4.2.4 Análisis de datos y estadísticos.....	91
4.3 Resultados.....	92
4.4 Discusión.....	99
4.5 Referencias.....	103
5.0 Capítulo V: Composición cariotípica de tres kinosternidos del Sureste de México, <i>K. leucostomum leucostomum</i>, <i>K. acutum</i> y <i>K. scorpioides cruentatum</i> (Testudines: Kinosternidae)	110
5.1 Introducción.....	112
5.2 Materiales y Métodos.....	114
5.2.1 Área de estudio y Recolecta.....	114
5.2.2 Muestra sanguínea y cultivo de linfocitos.....	114
5.2.3 Protocolo de preparación cromosómica.....	116
5.2.4 Tinción de muestras.....	116
5.2.5 Microscopía óptica y conteo cromosómico.....	117
5.2.6 Elaboración de cariotipos y estadística.....	117
5.3 Resultados.....	118
5.4 Discusión.....	130
5.5 Referencias.....	136
6.0 Capítulo VI: Conclusiones generales.....	141

Índice de Tablas	Pág.
Capítulo I	1
Tabla 1. Las nueve especies de tortugas dulceacuícolas de Tabasco y su estatus de conservación en la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) y la NOM-059-SEMARNAT-2010.....	5
Tabla 1.1. Diseño experimental para el desarrollo de procedimiento de cultivo “ <i>in vitro</i> ” de sangre periférica de las tortugas <i>K. l. leucostomum</i> , <i>K. s. cruentatum</i> y <i>K. acutum</i>	17
Capítulo II	25
Tabla 2. Número de células con daño y sin daño en la membrana celular, que fueron expuestas a diferentes tiempos de exposición con metanol absoluto y etanol desnaturalizado.....	37
Tabla 3. Resultados de la fase experimental II y respuesta de la estructura celular expuesta a dos métodos de tinción.....	41
Capítulo III	53
Tabla 4. Citometría de núcleos interfásicos en G1 y tamaño del genoma de la muestra estándar en clones de <i>O. mykiss</i>	60
Tabla 5. Contenido de ADN o valor-2C en las tortugas dulceacuícolas de Tabasco.....	61
Tabla 6. Individuos con anomalías genéticas: triploidía y tetraploidía.....	62
Capítulo IV	84
Tabla 7. Diseño experimental para el desarrollo de procedimiento de cultivo “ <i>in vitro</i> ” de sangre periférica de las tortugas <i>K. l. leucostomum</i> , <i>K. s. cruentatum</i> y <i>K. acutum</i>	89
Tabla 8. Promedio del conteo de linfocitos por día de cultivo y desviación estándar del cultivo celular a 25 °C vs 28 °C en la tortuga pochitoque común <i>K. l. leucostomum</i>	94
Tabla 9. Promedio del conteo de linfocitos por día de cultivo y desviación estándar del cultivo celular a 25 °C vs 28 °C en la tortuga pochitoque común <i>K. s. cruentatum</i>	95
Tabla 10. Promedio del conteo de linfocitos por día de cultivo y desviación estándar del cultivo celular a 25 °C vs 28 °C en la tortuga pochitoque común <i>K. acutum</i>	96
Capítulo V	110
Tabla 11. Nomenclatura de clasificación cromosómica.....	118
Tabla 12. Parámetros citogenéticos de los cromosomas homólogos en hembras y machos del pochitoque común <i>K. l. leucostomum</i> . Longitud promedio (µm), longitud relativa promedio (L.R.) y su clasificación.....	119
Tabla 13. Determinación cromosómica en mitosis de hembras y machos de la tortuga <i>K. l. leucostomum</i>	122
Tabla 14. Parámetros citogenéticos de los cromosomas homólogos en hembras y machos del pochitoque jahuactero <i>K. acutum</i> . Longitud promedio (µm), longitud relativa promedio (L.R.) y su clasificación.....	123
Tabla 15. Parámetros citogenéticos de los cromosomas homólogos en hembras y machos del pochitoque escorpión <i>K. s. cruentatum</i> . Longitud promedio (µm), longitud relativa promedio (L.R.) y su clasificación.....	127

Índice de Figuras

Pág.

Capítulo I	1
Figura 1. Las nueve especies de tortugas de agua dulce en Tabasco.....	6
Figura 2. Representación de caparazón y plastrón de las cinco especies de la familia Kinosternidae de Tabasco. Dibujos originales del autor de Tesis.....	9
Figura 3. Estructura del caparazón y plastrón de tres tortugas dulceacuícolas de Tabasco: I) <i>R. areolata</i> , II) <i>D. mawii</i> , III) <i>C. rossignonii</i>	11
Figura 4. Estructura del caparazón y plastrón de la especie <i>T. venusta venusta</i> (I).....	12
Capítulo II	25
Figura 5. Procedimiento para la obtención celular y análisis nuclear por frotis sanguíneo.....	33
Figura 6. Comportamiento de la membrana celular (eritrocitos sin daños en porcentajes) expuestos a metanol y etanol en las tortugas <i>T. v. venusta</i> , <i>S. triporcatus</i> y <i>R. areolata</i>	38
Figura 7. Células hematopoyéticas con pérdida severa de simetría en la estructura extracelular, intracelular y del citoplasma por efecto del metanol y tinción con Giemsa al 10% en las tortugas tropicales <i>T. v. venusta</i> , <i>S. triporcatus</i> y <i>R. areolata</i>	41
Figura 8. Comportamiento de la estructura celular eritrocitaria post-tinción (Giemsa 10% vs Giemsa madre) en <i>T. v. venusta</i> , <i>S. triporcatus</i> y <i>R. areolata</i>	42
Figura 9. Células hematopoyéticas con la estructura celular integra y normal de muestras sanguíneas de tres especies de tortugas dulceacuícolas <i>T. v. venusta</i> , <i>S. triporcatus</i> y <i>R. areolata</i> , que fueron tratadas con el mejor procedimiento de fijado (etanol desnaturalizado, 5 min) y tinción (Giemsa madre, 10 s)	43
Capítulo III	53
Figura 10. Histograma del contenido de ADN o valor 2C de la muestra estándar <i>O. mykiss</i> vs las tortugas de la familia Kinosternidae de Tabasco, en México: <i>K. l. leucostomum</i> , <i>K. acutum</i> , <i>K. s. cruentatum</i> , <i>S. triporcatus</i> y <i>C. angustatus</i> . Anomalías genéticas.....	63
Figura 11. Histograma del contenido de ADN o valor 2C de la muestra estándar <i>O. mykiss</i> vs <i>C. rossignonii</i> , <i>T. v. venusta</i> , <i>R. areolata</i> y <i>D. mawii</i>	64
Figura 12. Dendograma de relación con distancias euclidianas de todos los registros del contenido de ADN o valor 2C (pg) en la familia Kinosternidae y Chelydridae. Las fotografías de las tortugas representan a las especies de este estudio.....	66
Figura 13. Dendograma de relación con distancias euclidianas de todos los registros del contenido de ADN o valor 2C (pg) en la familia Emydidae. La fotografía de la tortuga representa a la especie <i>T. v. venusta</i> en este estudio.....	71
Figura 14. Dendograma de relación con distancias euclidianas de todos los registros del contenido de ADN o valor 2C (pg) en la familia Geoemydidae. La fotografía de la tortuga representa a la especie <i>R. areolata</i> en este estudio.....	72
Capítulo IV	84
Figura 15. Parámetros monitoreados en la incubación de células mononucleares: CO ₂ , TVOC, Temperatura, Humedad relativa.....	91

Figura 16. Comparación experimental de cultivo <i>in vitro</i> a temperatura 25 °C vs 28 °C en las tortugas dulceacuícolas <i>K. l. leucostomum</i> , <i>K. s. cruentatum</i> y <i>K. acutum</i> . Literales iguales en cada gráfico, representa que no hay diferencias significativas a $P \leq 0.05$ y en caso contrario las diferencias existen.....	97
Figura 17. Comparación del cultivo celular <i>in vitro</i> de linfocitos: Control vs Temperaturas A1 “25 °C” y B1 “28 °C” en las tortugas dulceacuícolas <i>K. l. leucostomum</i> , <i>K. s. cruentatum</i> y <i>K. acutum</i>	98
Capítulo V	110
Figura 18. Dispersiones cromosómicas y cariotipo estándar de hembras y machos en el pochitoque común <i>K. l. leucostomum</i>	121
Figura 19. Ideograma de pares homólogos de cromosomas del cariotipo estándar en el pochitoque <i>K. l. leucostomum</i> . Representación del brazo p cromosómico (en gris), centrómero (circunferencia) y brazo q cromosómico (en negro)	122
Figura 20. Dispersiones cromosómicas y cariotipo estándar de hembras y machos en el pochitoque jahuactero <i>K. acutum</i>	125
Figura 21. Ideograma de pares homólogos de cromosomas del cariotipo estándar en el pochitoque jahuactero <i>K. acutum</i> . Representación del brazo p cromosómico (en gris), centrómero (circunferencia) y brazo q cromosómico (en negro)	126
Figura 22. Dispersiones cromosómicas y cariotipo estándar de hembras y machos en el pochitoque escorpión <i>K. s. cruentatum</i>	129
Figura 23. Ideograma de pares homólogos de cromosomas del cariotipo estándar en el pochitoque escorpión <i>K. s. cruentatum</i> . Representación del brazo p cromosómico (en gris), centrómero (circunferencia) y brazo q cromosómico (en negro)	130

Índice de Anexos

	Pág.
Anexo I:	
Lámina I. Eritrocitos con tinción convencional de Giemsa y microscopía electrónica de barrido (MEB) en las tortugas <i>K. l. leucostomum</i> , <i>K. acutum</i> y <i>K. s. cruentatum</i>	81
Anexo II:	
Lámina II. Eritrocitos con tinción convencional de Giemsa y microscopía electrónica de barrido (MEB) en las tortugas <i>S. triporcatus</i> , <i>C. angustatus</i> y <i>C. rossignonii</i>	82
Anexo III:	
Lámina III. Eritrocitos con tinción convencional de Giemsa y microscopía electrónica de barrido (MEB) en las tortugas <i>R. areolata</i> , <i>D. mawii</i> y <i>T. v. venusta</i>	83
Anexo IV	
Lámina IV. Linfocitos de las tortugas dulceacuícolas <i>K. l. leucostomum</i> , <i>K. acutum</i> y <i>K. s. cruentatum</i>	109
Anexo V:	
Lámina V. Dispersiones cromosómicas típicas en hembras y machos de <i>K. acutum</i> , <i>K. s. cruentatum</i> y <i>K. l. leucostomum</i> aplicando el método de filtro LUT del software ZEN/2011 de Carl Zeiss.....	140

CAPÍTULO I

PROTOCOLO DE TESIS

1.1 CONTEXTO DEL ESTUDIO EN LAS TORTUGAS TROPICALES, NATIVAS DE TABASCO, MÉXICO

RESUMEN: El estado de Tabasco cuenta con nueve especies de tortugas dulceacuícolas. En los últimos años los estudios más frecuentes son los de espacio-temporal y microorganismos asociados a quelonios; mientras que los estudios de genética básica y molecular son insuficientes en el grupo de los testudines. En Tabasco solo se cuenta con un estudio de citogenética en *Kinosternon leucostomum leucostomum*, *Staurotypus triporcatus* y *Trachemys venusta venusta*, por lo que se desconoce totalmente la estructura citológica y genética de las seis especies restantes: *Kinosternon acutum*, *K. scorpioides cruentatum*, *Claudius angustatus*, *Chelydra rossignonii*, *Rhinoclemmys areolata* y *Dermatemys mawii*. Por ello, se realizó un estudio citológico constituido por el desarrollo de una técnica hematológica nueva para el estudio de eritrocitos, un estudio cariotípico a través de cultivo *in vitro* de sangre periférica y aplicación de técnica de citometría para determinar el tamaño del genoma, con la finalidad de describir por primera ocasión la estructura genética de las especies de tortugas dulceacuícola de Tabasco; además de generar información inédita en las especies y fomentar una mejor descripción en sus fichas biológicas existentes, desde el punto de vista individual como especie o como poblaciones con fines de conservación, y de aclaración de controversias taxonómicas.

1.1 INTRODUCCIÓN

Los estudios de citología, genética básica y genética molecular, en las especies de quelonios dulceacuícolas y marinos nativos, es un campo poco abordado en México y América Latina (Hernández-Guzmán, 2018; Méndez et al., 2013). Lo anterior, está sustentado en una revisión cuidadosa y detallada de los reportes científicos oficiales en el citado grupo de vertebrados (Quiroz-Herrera & Palacio-Baena, 2017; Rodríguez-Correa et al., 2017). A pesar de la importancia que ha tenido tales disciplinas en diversas partes del mundo, siendo fundamental para la descripción y determinación de nuevas especies de tortugas (Farkas et al., 2019; Poulakakis et al., 2015; Thomas et al., 2014) y para propósitos de conservación. En nuestro país, también se han descrito nuevas especies de tortugas dulceacuícolas como los casquitos *Kinosternon chimalhuaca* en Colima por Berry et al. (1997) y *K. vogti* en Jalisco (López-Luna et al., 2018). Paralelamente, los estudios espacio-temporales, de biología de la conservación y de microfauna en tortugas marinas y de agua dulce son los más frecuentes en la literatura de los últimos años en América Latina (Buchanan et al., 2017; Cueto-Mares et al., 2017; Donato-Rondón et al., 2018; García-De la Peña et al., 2019; Howell & Seigel, 2019; Silva-Brito et al., 2018; Valdez-Villavicencio et al., 2016; Zenteno-Ruiz et al., 2010).

La citogenética y citología básica han tomado en conjunto importancia en el sureste mexicano en la última década, particularmente en el estado de Tabasco, centrando estudios principalmente en organismos acuáticos, semiacuáticos y terrestres. A pesar de tales esfuerzos, el número de especies estudiadas hasta la fecha continúa reducido, en función de los registros taxonómicos en la región. Por ejemplo, dentro del grupo de los quelonios dulceacuícolas, solo se han reportado estudios citológicos en ejemplares con distribución en el sureste de México. Estos estudios hacen referencia a la tortuga blanca *Dermatemys mawii* (Carr et al., 1981), así como a *K. leucostomum leucostomum*, *Staurotypus triporcatus* y *Trachemys venusta venusta* (Hernández-Guzmán et al., 2014), con ejemplares de Chiapas y Tabasco respectivamente. Lo que representa, que solo se han estudiado la genética básica, en cuatro especies de las nueve registradas con distribución solo en Tabasco. En cuanto al resto del país, los estudios citológicos son aún desconocidos y continúan como una incógnita necesaria de resolver en los próximos años.

A través de los estudios de citología, genética básica y genética molecular, se han descubierto citotipos particulares en algunas especies acuáticas nativas de Tabasco, principalmente en el complemento cromosómico de los cariotipos de ejemplares procedentes de esta región. Entre los hallazgos destaca la presencia de microcromosomas tipo “B” y formulas cromosómicas variables entre poblaciones (Hernández-Guzmán et al., 2014; Majtánová et al., 2017). Dichas particularidades son atributos genéticos especiales y únicos entre poblaciones, lo que permite sugerir la existencia de poblaciones genéticamente diferenciadas que podrían requerir un manejo especial para su conservación, o bien, servir como base para el establecimiento de caracteres citológicos para clasificación taxonómica.

Por lo anterior, la presente Tesis doctoral se enfocó al desarrollo de una nueva técnica hematológica económica para el estudio celular en tortugas dulceacuícolas, para su empleo en estudios básicos/citométricos para comprender la dinámica nuclear en mitosis y el tamaño del genoma en estas células. Asimismo, se desarrolló de un protocolo para el cultivo *in vitro* de linfocitos para el establecimiento de la estructura cromosómica y cariotípica en las especies de tortugas dulceacuícolas kinostérnidos presentes en Tabasco.

1.2 MARCO TEÓRICO

La revisión bibliográfica realizada sobre los estudios de genética, citología y fisiología básica en especies nativas y endémicas de reptiles del país, particularmente aquellas del estado de Tabasco, ha revelado que la información es sumamente escasa, prácticamente desconocida y con amplio potencial para descubrir estructuras celulares y genéticas de interés científico en el área de las ciencias biológicas y evolución (Hernández-Guzmán et al., 2014, Mazzoleni et al., 2019); así como para su empleo en ciencia aplicada (Arias-Rodriguez, 2019).

En México, y en acuerdo con Flores-Villela y García-Vázquez (2014), se han reportado entre los Testudines a diez familias: Cheloniidae (con 4 géneros y 6 especies), Chelydridae (un género y una especie), Dermatemydidae (un género y una especie), Dermochelyidae (un género y una especie), Emydidae (5 géneros y 14 especies), Geoemydidae (un género y 3 especies), Kinosternidae (2 géneros y 15 especies), Staurotypidae (2 géneros y 3 especies), Testudinidae (un género y 3 especies) y Trionychidae (un género y una especie). Por otro lado, en Tabasco, se han catalogado a nueve especies de tortugas de agua dulce en acuerdo con Flores-Villela y García-Vázquez (2014), Lee (2000) y Barragán-Vázquez et al. (2022): *Staurotypus triporcatus*, *Kinosternon acutum*, *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum*, *Claudius angustatus*, *Trachemys v. venusta*, *Chelydra rossignonii*, *Rhinoclemmys areolata* y *Dermatemys mawii* (Tabla 1). Curiosamente, todas las especies de tortugas de agua dulce con pocos estudios de biología y genética, están listadas, a excepción de *C. rossignonii* y *T. v. venusta* en categorías de riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010: dos especies en Peligro de extinción (P) *C. angustatus* y *D. mawii*, dos especies Amenazadas (A) *S. triporcatus* y *R. areolata*, y tres Sujeta a protección especial (Pr) *K. acutum*, *K. l. leucostomum* y *K. s. cruentatum*. Dicha condición, hace urgente el desarrollo de estudios como los señalados previamente. Algunos de los escasos reportes en genética básica y molecular de tortugas son tan antiguos que, en la actualidad, se ha comprobado información errónea en cuanto al número diploide de cromosomas, fórmula cromosómica y presencia de cromosomas sexuales como lo señalan Hernández-Guzmán et al. (2014) y Mazzoleni et al. (2019).

Tabla 1. Las nueve especies de tortugas dulceacuícolas de Tabasco y su estatus de conservación en la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) y la NOM-059-SEMARNAT-2010.

	Nombre común	Nombre científico	Familia	Estatus IUCN	Estatus NOM
1	Tres lomos, Guao	<i>Staurotypus triporcatus</i>	Kinosternidae	NT	A
2	Pochitoque jahuactero	<i>Kinosternon acutum</i>	Kinosternidae	NT	Pr
3	Pochitoque	<i>K. leucostomum leucostomum</i>	Kinosternidae	-	Pr
4	Tortuga de barro escorpión	<i>K. scorpioides cruentatum</i>	Kinosternidae	-	Pr
5	Taimán	<i>Claudius angustatus</i>	Kinosternidae	NT	P
6	Hicotea	<i>Trachemys venusta venusta</i>	Emydidae	-	-
7	Chiquiguo	<i>Chelydra rossignonii</i>	Chelydridae	VU	-
8	Mojina	<i>Rhinoclemmys areolata</i>	Geoemydidae	NT	A
9	Tortuga blanca	<i>Dermatemys mawii</i>	Dermatemydidae	CR	P

NT= Casi amenazado, LC= Preocupación menor, VU= Vulnerable, CR= Peligro crítico, P= Peligro de extinción, A= Amenazada, Pr= Sujeta a protección especial. El guion representa las especies aún no evaluadas por la IUCN y su ausencia en la NOM.

1.2.1. Taxonomía de las tortugas dulceacuícolas de Tabasco

Las claves dicotómicas para la identificación de tortugas de México se remontan a los trabajos de Smith y Smith (1979) quienes propusieron criterios para la identificación a nivel de familias. En su obra incluyen cuatro de las cinco familias que habitan actualmente en Tabasco: (Kinosternidae, Dermatemydidae, Chelydridae y Emydidae). En aquellos años, la tortuga mojina *R. areolata* era ubicada dentro de la familia Emydidae de acuerdo con Ernst (1989). No fue sino hasta más tarde cuando la especie fue reubicada en una nueva familia (Geoemydidae), clasificación que se ha mantenido en las nomenclaturas más recientes (Lee, 2000).

A pesar de la variedad de especies que hay en el estado, Tabasco no cuenta con una nomenclatura propia para la identificación de especies de tortugas dulceacuícolas, por lo que

es necesario recurrir a múltiples referencias, muchas de ellas de difícil acceso. Para ello, el presente documento ofrece una nomenclatura para la identificación de especies de tortugas de agua dulce con distribución natural, exclusiva para el estado de Tabasco. Esta nomenclatura se realizó con un compendio de las claves dicotómicas más usadas en la región para las nueve especies registradas en el estado, complementando con observaciones y notas personales de caracteres merísticos que no han sido señalados con anterioridad en cada una de las especies:

- Para las especies que se ubican en la familia Kinosternidae, se utilizó la nomenclatura propuesta por Ernst (1989) modificada, y tomando en consideración los listados taxonómicos y claves más actuales en las nueve especies (Lee, 2000; van Dijk et al., 2014; Maslim et al., 2018).
- En la especie de la familia Geoemydidae, Dermatemydidae y Chelydridae, se utilizó la nomenclatura de Smith y Smith (1979).
- Para la familia Emydidae, se utilizaron las claves dicotómicas propuesta por Soria-Guzmán (2016) para especies del género *Trachemys*.



Figura 1. Las nueve especies de tortugas de agua dulce en Tabasco.

1.2.2. Claves de identificación de especies de tortugas dulceacuícolas de Tabasco

1.2.3. Familia Kinosternidae

1 a) Escudo gular más ancho en la superficie dorsal del plastrón que en la superficie ventral; machos con órganos de unión presentes; generalmente con una sola franja post-orbital amplia y ligera en la cabeza..... **K. leucostomum leucostomum** (Figura 2-I)

b) El escudo gular no es más ancho en la superficie dorsal del plastrón que en la superficie ventral; los machos carecen de órganos de agarre; no hay una sola franja post-orbital amplia y ligera en la cabeza..... 2

2 a) Escudo abdominal muy largo, más del 33% de la longitud total del plastrón; primera vertebral en contacto con la segunda marginal..... **K. acutum** (Figura 2-II)

b) Escudo abdominal no extremadamente largo, menos del 33% de la longitud total del plastrón; la primera vertebral puede contactar la costura entre el primer y segundo marginal, pero rara vez toca gran parte de la segunda marginal..... 3

3 a) Caparazón extendido con tres quillas..... 4

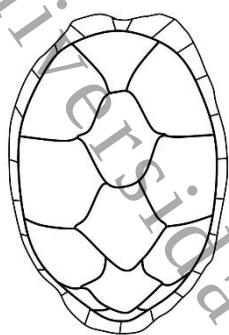
b) Caparazón reducido con tres quillas..... 5

4 a) Margen anterior del lóbulo plastral posterior recto **K. scorpioides cruentatum** (Figura 2-III)

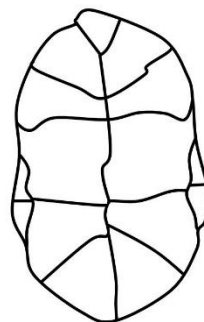
b) Las quillas carapaciales dorsolaterales extienden la longitud del caparazón de los márgenes anterior a posterior; lóbulo plastral anterior más corto que el lóbulo posterior; cabeza y mandíbulas con un patrón de reticulaciones oscuras... **S. triporcatus** (Figura 2-IV)

5 a) Plastron en forma de rombo y muy reducido a comparación de la longitud ventral; cabeza grande de color grisáceo y con capacidad de extenderla a lo largo de su caparazón **C. angustatus** (Figura 2-V)

I. *K. leucostomum leucostomum*

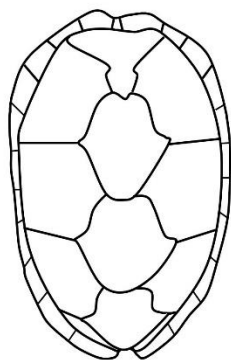


Caparazón

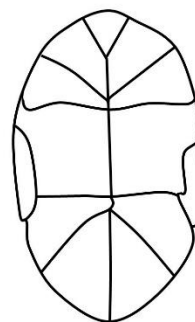


Plastrón

II. *K. acutum*

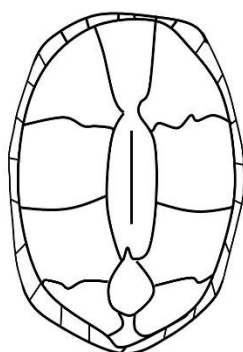


Caparazón

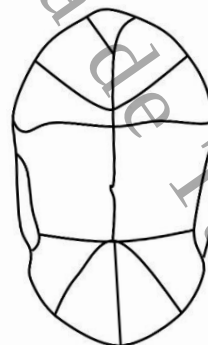


Plastrón

III. *K. scorpioides cruentatum*

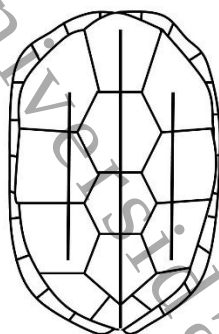


Caparazón

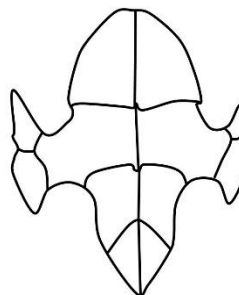


Plastrón

IV. *S. triporcatus*

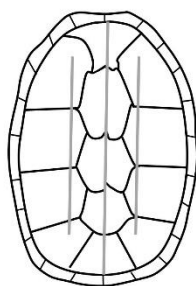


Caparazón

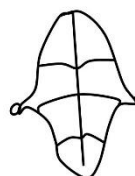


Plastrón

V. *C. angustatus*



Caparazón



Plastrón

Figura 2. Representación de caparazón y plastrón de las cinco especies de la familia Kinosternidae de Tabasco; I) *Kinosternon leucostomum leucostomum*, II) *K. acutum*, III) *K. scorpioides cruentatum*, IV) *Staurotypus triporcatus*, V) *Claudius angustatus*; basado en caparazones y plastrones reales de cada especie. Dibujos originales del autor de Tesis.

1.2.4. Familia Geoemydidae

- 1 a) Ápice de tomio maxilar con muesca..... 2
2 a) No hay barras oscuras claras en toda la cabeza, las inframarginales carecen de manchas oscuras, es decir, es todo claro..... ***Rhinoclemmys areolata*** (Figura 3-I)

Nota: Tabasco cuenta con una sola especie de la familia Geoemydidae, la cual además de presentar caracteres sistemáticos y taxonómicos distintivos, es notablemente diferenciada de otras especies del estado por su piel amarillenta y con puntos oscuros en sus patas anteriores y posteriores, característica que, en conjunto, no se observan en las demás especies de tortugas dulceacuícolas de Tabasco. Además, su plastrón es parcialmente oscuro o marrón.

1.2.5. Familia Dermatemydidae

- 1 a) Caparazón separado completamente del plastrón por una hilera completa de inframarginalia, caparazón liso y con tres quillas ligeramente pronunciadas
..... ***Dermatemys mawii*** (Figura 3-II)

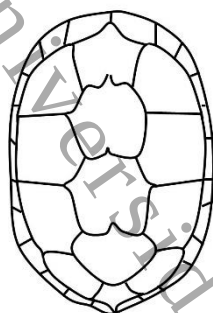
Nota: Es la única especie representativa de la familia Dermatemydidae en todo el mundo, se diferencia notablemente de las otras especies de tortugas dulceacuícolas de Tabasco por su tonalidad grisácea uniforme en su piel en conjunto con el caparazón.

1.2.6. Familia Chelydridae

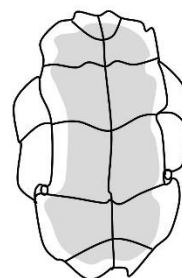
1. a) Apéndice tegumentario en cabeza y cuello, los apéndices son largos y aplanados; la longitud de cola es tan larga como el caparazón..... ***Chelydra rossignonii*** (Figura 3-III)

Nota: Los escudos caudales y los escudos marginales con dirección a escudos caudales, forman en conjunto una apariencia aserrada en la parte trasera del caparazón, condición que no es observada en ninguna de las demás especies de tortugas dulceacuícolas de Tabasco.

I. *R. areolata*

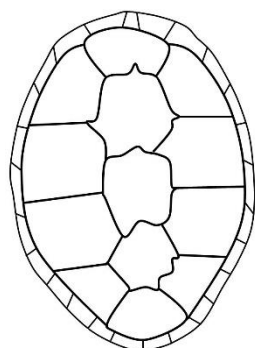


Caparazón

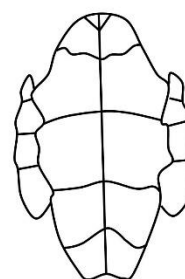


Plastrón

II. *D. mawii*

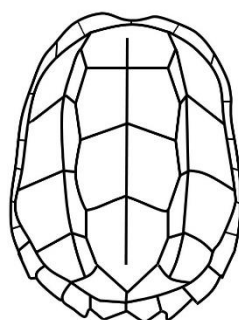


Caparazón

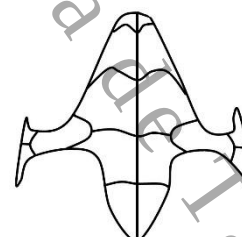


Plastrón

III. *C. rossignonii*



Caparazón



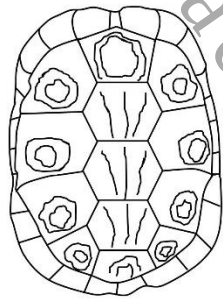
Plastrón

Figura 3. Estructura del caparazón y plastrón de tres tortugas dulceacuícolas de Tabasco: I) *R. areolata*, II) *D. mawii*, III) *C. rossignonii*.

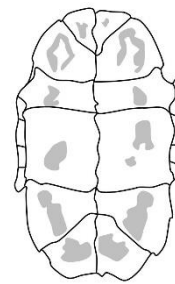
1.2.7. Familia Emydidae

1 a) Mancha postorbital rojo brillante y aislado de cualquier franja de la cabeza. Patrón del caparazón compuesto por franjas transversales. Patrón plastral formado por manchas oscuras, nunca por franjas..... *Trachemys venusta venusta* (Figura 4-I)

I. *T. venusta venusta*



Caparazón



Plastrón

Figura 4. Estructura del caparazón y plastrón de la especie *T. venusta venusta* (I).

Nota: La presente clave se elaboró con las nomenclaturas de Legler y Vogt (2013), Ernst y Barbour (1989), Smith y Smith (1979), observaciones personales y atendiendo la última actualización en taxonomía, sinonimia y distribución de todas las especies de tortugas en el mundo de Rhodin et al. (2021).

1.3 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, las tortugas o quelonios han tomado mayor interés científico, tanto por la preocupante pérdida de especies nativas alrededor del mundo, principalmente en las regiones tropicales (Maslim et al., 2018), como por el descubrimiento de nuevas especies. En el caso particular de la vertiente del Pacífico de México, destacan los reportes de *Kinosternon vogti* (López-Luna et al., 2018) y *K. chimalhuaca* (Berry et al., 1997). Tales hallazgos, indican que existen especies crípticas por descubrir y describir con base en estudios de biología convencional. Además, estas investigaciones pueden completarse con herramientas de genética, citología y biología molecular, que permitan generar mayor número de atributos biológicos y genéticos para separar especies y poblaciones con particularidades especiales.

En la mayoría de las especies de tortugas a nivel mundial persiste una notable carencia de conocimiento básico y especializado sobre su biología y ecología; hecho que no se descarta en las especies nativas de México y en lo particular de Tabasco. En general, de estas especies solo se dispone de información relativa a los atributos taxonómicos que fueron considerados para su descripción taxonómica y de distribución geográfica, con algunas excepciones genéticas como en la tortuga blanca *D. mawii* de Gallardo-Álvarez et al. (2019) y la hicotea *T. v. venusta* de Recino-Reyes et al. (2020).

El escaso conocimiento de la genética básica que hay en las tortugas nativas de Tabasco, sobre todo las de origen dulceacuícola, indican como señalan y en acuerdo con Arias-Rodriguez (2019a) y Arias-Rodriguez et al. (2019b), la creciente necesidad de fomentar el desarrollo de estudios encaminados a conocer los atributos citológicos, genéticos básicos y moleculares en las especies nativas del estado de Tabasco, sobre todo en aquellos grupos y especies que están consideradas en riesgo crítico, debido a que los resultados derivados de tales estudios sirven de herramientas para la toma de decisiones en programas de manejo reproductivo, conservación, repoblación, translocación y taxonomía moderna.

En dicho sentido, la comprensión y empleo de los resultados derivados de los estudios citológicos y genéticos con el empleo de métodos novedosos y herramientas de alta resolución de imágenes, como el cultivo *in vitro* de células sanguíneas, la microscopía electrónica de barrido y la hibridación *in situ* en otros países es una realidad desde el siglo

pasado, las cuales tiene amplias aplicaciones en programas ecológicos de repoblación, translocación, reproducción y mejoramiento genético.

Por todo lo anterior, el objetivo principal de la presente Tesis doctoral es el de comprender el núcleo mitótico de las tortugas tropicales mediante el análisis de la composición de cantidad de nucleótidos y el tamaño del genoma, aplicando técnica de citometría de Feulgen. Asimismo, se plantea el desarrollo de un protocolo de cultivo *in vitro* de sangre periférica (linfocitos) y del empleo de herramientas citogenéticas para determinar la estructura cariotípica en tortugas dulceacuícolas del estado de Tabasco. El cumplimiento de estos objetivos ha contribuido significativamente al entendimiento de la biología celular y genética de las tortugas dulceacuícolas de Tabasco, generando información valiosa para su conservación, manejo reproductivo y estudio taxonómico.

1.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

A lo largo de la revisión bibliográfica sobre varios aspectos de la taxonomía, biología, ecología, genética, reproducción, entre otros campos de estudios en las tortugas tropicales nativas de Centroamérica y Sureste mexicano, fue evidente la carencia de estudios en genética y citología con énfasis en comprender la diversidad biológica de las especies de la región. En dicho sentido, la investigación principal en el presente estudio fue la de evaluar y comparar la dinámica intracitoplásmica de las células mitóticas de nueve especies de tortugas tropicales, para responder la siguiente pregunta de investigación: ¿La aplicación de métodos citológico-genético puede determinar la relación de la dinámica celular con la diversidad de especies?

1.5 HIPÓTESIS

El análisis citológico-genético en células eritrocitarias en diferentes poblaciones de las nueve especies de tortugas dulceacuícolas que se distribuyen en Tabasco, en el sureste mexicano y Centroamérica, no presentan diferencias significativas en sus células y en su genoma.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo general

Comprender y describir el núcleo mitótico de las tortugas tropicales nativas de Tabasco, por medio de citología, citometría, cultivo “*in vitro*” de linfocitos y cariólogía para determinar el tamaño del genoma, el contenido total de nucleótidos y estandarización cariotípica.

1.6.2. Objetivos específicos

- I. Desarrollar una técnica hematológica económica para tortugas dulceacuícolas.
- II. Determinar el tamaño del genoma mitótico y contenido total de nucleótidos por herramientas de citometría y microscopía óptica de *Staurotypus triporcatus*, *Trachemys venusta venusta*, *Kinosternon acutum*, *K. leucostomum leucostomum*, *K. scorpioides cruentatum*, *Claudius angustatus*, *Chelydra rossignonii*, *Rhinoclemmys areolata* y *Dermatemys mawii*.
- III. Desarrollar y establecer un protocolo para el cultivo “*In vitro*” de células linfocitarias empleando como modelo biológico a las tortugas *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum*.
- IV. Describir detalladamente la estructura cromosómica en mitosis de las hembras y machos de las tortugas, *K. l. leucostomum*, *K. acutum* y *K. s. cruentatum*.

1.7 METODOLOGÍA

1.7.1. Área de Estudio y Recolecta

La captura de los ejemplares en vida silvestre se llevó a cabo con el permiso federal de la SEMARNAT (SGPA/DGVS/04315), para la recolecta de *Staurotypus triporcatus*, *Kinosternon acutum*, *K. scorpioides cruentatum*, *K. leucostomum leucostomum*, *Trachemys venusta venusta*, *Claudius angustatus*, *Chelydra rossignonii*, *Rhinoclemmys areolata* y *Dermatemys mawii*, con observación visual en las lagunas del municipio de Centro, en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla, en la localidad Federico Álvarez de Jonuta y en el Poblado Multe de Balancán, en el estado de Tabasco, Sureste de México. Los individuos

recolectados, fueron mantenidos vivos en tanques de fibra de vidrio bajo las condiciones necesarias de alimentación y agua.

1.7.2. Desarrollo de una nueva técnica hematológica económica para tortugas dulceacuícolas

Se extrajeron muestras sanguíneas de la vena coccígea, Jenkins-Perez (2012), Campbell (2015), Ballard y Cheek (2017) en tres especies modelo de tortugas tropicales *T. v. venusta*, *S. triporcatus* y *R. areolata* y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicó un diseño experimental basado en comparación de dos técnicas de fijación de frotis sanguíneo (Metanol absoluto vs Etanol desnaturalizado), así como la comparación de dos métodos de tinción de muestras post-frotis fijados (Giemsa 10% vs Giemsa madre). Ambos casos fueron evaluados por diferentes tiempos de exposición de 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 min para los dos métodos de fijación; mientras que para las tinciones se emplearon 1.0, 5.0, 10.0 y 20.0 min para Giemsa 10% y 5 s, 10 s, 20 s y 30 s para Giemsa madre. Finalmente, las muestras se analizaron y evaluaron por microscopía óptica para determinar y caracterizar una técnica hematológica nueva y económica para células de tortugas dulceacuícolas.

1.7.3. Tamaño del Genoma por Análisis Nuclear en Microscopía y Citometría

Se tomaron muestras de sangre periférica, y las preparaciones hematológicas se fijaron en etanol desnaturalizado por 5 min, luego se dejaron secar a temperatura ambiente para después teñirse con Giemsa (Merk®) al 10% (Kligerman & Bloom, 1977). Se eliminaron los restos del colorante con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Las preparaciones hematológicas, se mantuvieron en porta laminillas a 4°C hasta el análisis bajo el microscopio óptico de acuerdo con las recomendaciones de Galarza-Hernández (2017), con un microscopio óptico AxioScope A1 (Carl Zeiss®), equipado con una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss) y en conjunto con el software ZEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011). Para la determinación del número y tamaño de células con sus respectivos núcleos en micrómetros, se utilizó la técnica óptica en campo claro y análisis de imágenes de eritrocitos, aplicando el método de citometría de Feulgen y modificaciones a las técnicas de López-Hernández (2017) y Osorio-Pérez (2017).

1.7.4. Procedimiento de Cultivo “in vitro”

La técnica de cultivo *in vitro* de sangre periférica de linfocitos que se empleó fue la de Fujiwara et al. (2001) y atendiendo las modificaciones y recomendaciones de Majtánová et al. (2017), la cual consiste en extraer 3 ml de sangre con una jeringa previamente heparinizada. Una vez extraído el plasma, se realizaron los cultivos sobre 5 ml de Medio, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de solución antibiótica antimicótica con proporción de 0.5 mg/5 ml de Medio, Fitohemaglutinina-P en proporción 90 mg/5 ml de Medio, Kanamicina con 0.3 mg/5 ml de Medio y 0.175 µl de metanol al 10%. Todo lo anterior en acuerdo con lo señalado en el diseño de la Tabla 1. Después se dejó incubar por 120 hrs y se agregarán 50 µl de colchicina al 0.1% por cada 5 ml de Medium. Se aplicó tratamiento con solución hipotónica KCl 0.075 M durante 8 min. Posteriormente las muestras se fijaron a 3:1 (3 de metanol y 1 de ácido acético), haciendo tres recambios (Tabla 1); para finalmente realizar la búsqueda de dispersiones cromosómicas bajo los criterios de selección cromosómica de Hernández-Guzmán (2018).

Tabla 1.1. Diseño experimental para el desarrollo de procedimiento de cultivo “*in vitro*” de sangre periférica de las tortugas *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum*.

Tratamiento	Sangre periférica	Aislamiento de linfocitos	Medio de cultivo	Antibiótico	Fitohematoglutinina	Temperatura	Replicas Por especie
Control/a	Si	No	No	Si	No	25°C	3
A I	Si	Si	Si	Si	Si	25°C	3
Control/b	Si	No	No	Si	No	28°C	3
B I	Si	Si	Si	Si	Si	28°C	3

1.7.5. Elaboración de cariotipos y análisis estadístico

Las dispersiones cromosómicas, fueron analizadas y medidas en micrómetros bajo el criterio de Levan et al. (1964) para la elaboración de cariotipos, con proporción de brazos $r=q/p$, índice centromérico $i=100(p/p+q)$ y la diferencia entre brazos cromosómicos $d=r-1(10)/r+1$, donde “p” corresponde al brazo corto y “q” al brazo largo, para la caracterización de su estructura y ultraestructura, además se elaborarán ideogramas utilizando el software *IdeoKar* de Mirzaghaderi y Marzangi (2015) y aplicando pruebas estadísticas acorde a los resultados a través del software SigmaPlot® 12.3 de Systat Software Inc®.

[illegible]

1.9 REFERENCIAS CITADAS

- Arias-Rodriguez, L. (2019). Resumen ejecutivo. Diversidad genética. En: La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado. Vol. II. (pp. 389-390). CONABIO, México.
- Arias-Rodriguez, L., Álvarez-González, C.A., Indy, J.R., Lagunes-Espinoza, L.C., Páramo-Delgadillo, S., Burelo-Ramos, C.M., Ruiz-Carrera, V., Gómez-Cruz, R. y del Rivero-Bautista, N. (2019a). Perspectivas de los estudios de genética y biotecnología en las especies nativas. Diversidad genética. En: La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado. Vol. II. (pp. 391-398). CONABIO, México.
- Arias-Rodriguez, L., Indy, J.R., Páramo-Delgadillo, S. y Álvarez-González, C.A. (2019b). Avances en el conocimiento genético de la biodiversidad. Diversidad genética. En: La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado. Vol. II. (pp. 399-404). CONABIO, México.
- Ballard, B. y Cheek, R. (2017). Exotic animal medicine for the veterinary technician. Third Edition. Wiley Blackwell. Iowa, USA. 516 p.
- Barragán-Vázquez, M.R., Ríos-Rodas, L., Fucsko, L.A., Porras, L.W., Mata-Silva, V., Rocha, A., DeSantis, D.L., García-Padilla, E., Johnson, J.D. y Wilson, L.D. (2022). The herpetofauna of Tabasco, Mexico: composition, distribution, and conservation status. *Amphibian & Reptile Conservation* 16(2): 1-61.
- Berry, J.F., Seidel, M.E. y Iverson, J.B. (1997). A new species of mud turtle (Genus *Kinosternon*) from Jalisco and Colima, Mexico, with notes in its natural history. *Chelonian Conservation and Biology*. 2: 329-337.
- Buchanan, S.W., Buffun, B. y Karraker, N.E. (2017). Responses of a spotted turtle (*Clemmys guttata*) population to creation of early-successional habitat. *Herpetological Conservation and Biology*. 12: 688-700.
- Campbell, T.W. (2015). Exotic animal hematology and cytology. Fourth Edition. Wiley Blackwell. Iowa, USA. 402 p.
- Carr, J.L., Bickham, J.W. y Dean, R.H. (1981). The karyotype and chromosomal banding patterns of the Central American river turtle *Dermatemys mawii*. *Herpetologica*. 37: 92-95.

- Cueto-Mares, M.A., Castañeda-Gaytán, G., Becerra, E. y Rubio-Rincón, A. (2017). Ecología espacial y direccionalidad de hembras de *Terrapene Coahuila* en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 88: 860-866.
- Donato-Rondón, J.C., González-Trujillo, J.D., Romero, B. y Castro-Rebolledo, M.I. (2018). Diatom assemblages associated with turtle carapaces in the Neotropical region. *Revista de Biología Tropical*. 66: 1362-1372.
- Ernst, C.H., y Barbour, R.W. (1989). *Turtles of the world* (1st Edition). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Farkas, B., Ziegler, T., Pham, C.T., Ong, A.V. y Fritz, U. (2019). A new species of *Pelodiscus* from northeastern Indochina (Testudines, Trionychidae). *Zookeys*. 824: 71-86.
- Flores-Villela, O. y García-Vázquez, U.O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 467-475.
- Fujiwara, A., Nishida-Umehara, C., Sakamoto, T., Okamoto, N., Nakayama, I. y Abe, S. (2017). Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica*. 111: 77-89.
- Galarza-Hernández, L. (2017). Efectos del ácido 2,4- Diclorofenoxiacético sobre la sobrevivencia y las células sanguíneas de juveniles de la tilapia *Oreochromis niloticus*. [Tesis de Licenciatura en Biología]. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 45 p.
- Gallardo-Alvárez, M.I., Leshner-Gordillo, J.M., Machkour-M'Rabet, S., Zenteno-Ruiz, C.E., Olivera-Gómez, L.D., Barragán-Vázquez, M.R., Ríos-Rodas, L., Valdés-Marín, A., Vázquez-López, H.G. y Arriaga-Weiss, S.L. (2019). Genetic diversity and population structure of founders from wildlife conservation management units and wild populations of critically endangered *Dermatemys mawii*. *Global Ecology and Conservation*. 19: e00616.
- García-De la Peña, C., Rojas-Domínguez, M., Ramírez-Bautista, A., Vaca-Paniagua, F., Díaz-Velázquez, C., Ávila-Rodríguez, V., Valenzuela-Núñez, L.M. y Meza-Herrera, C.A. (2019). Microbiota bacteriana oral de la tortuga del bolsón *Gopherus flavomarginatus* en la Reserva de la Biósfera Mapimí, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 90: 1-14.

- Hernández-Guzmán, J. (2018). Caracterización cromosómica de las tortugas *Kinosternon leucostomum*, *Staurotypus triporcatus* y *Trachemys scripta* nativas de Tabasco, México. [Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales]. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. 52 p.
- Hernández-Guzmán, J., Indy, J.R., Yasui, G.S. y Arias-Rodriguez, L. (2014). Los cromosomas de las tortugas tropicales: *Kinosternon leucostomum*, *Staurotypus triporcatus* (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). Revista de Biología tropical. 62: 671-688.
- Howell, H.J. y Seigel, R.A. (2019). The effects of road mortality on small, isolated turtle populations. Journal of Herpetology. 53: 39-46.
- Jenkins-Perez J. (2012). Hematologic evaluation of reptiles: A diagnostic mainstay. Veterinary Technician. 33(8): 1-8.
- Kligerman, A.D. y Bloom, S.E. (1977). Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 34: 266-269.
- Lee, J.G. (2000). A field guide to the amphibians and reptiles of the Maya world: The lowlands of Mexico, northern Guatemala and Belize. Cornell University Press. 402 p.
- Legler, J. y Vogt, R.C. (2013). The turtles of Mexico: Land and freshwater forms. (1st Edition). Berkeley: University of California Press.
- Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas. 52: 201-220.
- López-Hernández, J.C. (2017). Biología, fisiología espermática básica y efecto de la radiación ultravioleta sobre la fisiología e integridad de las células espermáticas del bagre tropical *Rhamdia laticauda*. [Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales]. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 136 p.
- López-Luna, M.A., Cupul-Magaña, F.G., Escobedo-Galván, A.H., González-Hernández, A.J., Centenero-Alcalá, E., Rangel-Mendoza, J.A., Ramírez-Ramírez, M.M. y Cazares-Hernández, E. (2018). A distinctive new species of mud turtle from western Mexico. Chelonian Conservation and Biology. 17: 2-13.
- López-Luna, M.A., Venegas-Anaya, M., Cupul-Magaña, F.G., Rangel-Mendoza, J.A. y Escobedo-Galván, A.H. (2021). Mitochondrial DNA data support the recognition of

- the mud turtle, *Kinosternon vogti* (Cryptodira: Kinosternidae). *Chelonian Conservation and Biology*. 20(1): 97-102.
- Majtánová, Z., Symonová, R., Arias-Rodriguez, L., Sallan, L. y Ráb, P. (2017). “Holostei versus Halecostomi” Problem: Insight from cytogenetics of ancient nonteleost actinopterygian fish, bowfin *Amia calva*. *Journal of Experimental Zoology*. 620-628.
- Maslim, A-S., Chen, P.N, Coutinho, M.E., Drummond, G.M., Gallego-Garcia, N., Guntoro, J., Hofmeyr, M.D., Iverson, J.B., Kiester, A.R., Lewis, R.E., McCormack, T., Mifsud, D., Páez, V.P., Palomo-Ramos, R., Platt, K., Platt, S., Ríos-Arana, J., Saumure, R., Schleicher, A., Schoppe, S., Som, S., Terry, A. y Vogt, R.C. (2018). *TURTLES IN TROUBLE: The World's 25+ Most Endangered Tortoises and Freshwater Turtles-2018*. Eds: Craig B.S., Rhodin, A.G.J., van Dijk, P.P., Horne, B.D., Blanck, T., Goode, E.V., Hudson, R., Mittermeier, R.A., Currylow, A., Eisemberg, C., Frankel, M., Georges, A., Gibbons, P.M., Juvik, J.O., Kuchling, G., Luiselli, L., Haitao, S., Singh, S. y Walde, A. Turtle Conservation Coalition IUCN SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group, Turtle Conservancy, Turtle Survival Alliance, Turtle Conservation Fund, Conservation International, Chelonian Research Foundation, Wildlife Conservation Society, and Global Wildlife Conservation. OJAI, California, United States of America. 79 p.
- Mazzoleni, S., Augstenová, B., Clemente, L., Auer, M., Fritz, U., Praschag, P., Protiva, T., Valenský, P., Kratochvíl, L. y Rovatsos, M. (2019). Turtles of the genera *Geoemyda* and *Pangshura* (Testudines: Geoemydidae) lack differentiated sex chromosomes: the end of a 40 year error cascade for *Pangshura*. *PeerJ*. 1-15.
- Méndez, D., Cuevas, E., Navarro, J., González-Garza, B.I. y Guzmán-Hernández, V. (2013). Rastreo satelital de las hembras de tortuga blanca *Chelonia mydas* y evaluación de sus ámbitos hogareños en la costa norte de la Península de Yucatán, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 48: 497-509.
- Mirzaghaderi, G. y Marzangi, K. (2015). IdeoKar: an ideogram constructing and karyotype analyzing software. *Caryologia*. 68: 31-35.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones

- para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 1-77 p.
- Osorio-Pérez, A. (2017). Fisiología y microestructura espermática del pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus*. [Tesis de Licenciatura en Biología]. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 62 p.
- Poulakakis, N., Edwards, D.L., Chiari, Y., Garrick, R.C., Russello, M.A., Benavides, E., Watkins-Colwell, G.J., Glaberman, S., Tapia, W., Gibbs, J.P., Cayot, L.J. y Caccone, A. (2015). Description of a new Galapagos Giant tortoise species (*Chelonoidis*; Testudines: Testudinidae) from Cerro Fatal on Santa Cruz Island. Public Library of Science One. 10: 1-18.
- Quiroz-Herrera, V.H. y Palacio-Baena, J. (2017). Niveles sanguíneos de biomarcadores de daño genético en eritrocitos de *Lepidochelys olivácea* (Cheloniidae) en Colombia. Acta Biológica Colombiana. 22: 322-230.
- Recino-Reyes, E.B., Leshner-Gordillo, J.M., Machkour-M´Rabet, S., Gallardo-Alvarez, M.I., Zenteno-Ruiz, C.E., Olivera-Gómez, L.D., Valdés-Marín, A., Gómez-Carrasco, G., Ríos-Rodas, L., Barragán-Vázquez, M.R. y Hernández-Martínez, R. (2020). Conservation and management of *Trachemys venusta venusta* in Southern Mexico: a genetic approach. Tropical Conservation Science. 13: 1-20.
- Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., Bour, R., Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H.B., y van Dijk, P.P. (2021). Turtles of the world. Annotated checklist and Atlas of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. *Chelonian Research Monographs*, 8, 1-472.
- Rodríguez-Correa, H., González-Rodríguez, A. y Oyama, K. (2017). Perspectivas de la ecología molecular en un país megadiverso. Revista Mexicana de Biodiversidad. 88: 3-13.
- Silva-Brito, E., Vogt, R.C., Valadão, R.M., Fernandes-França, L., Penha, J. y Strüssmann, C. (2018). Population ecology of the freshwater turtle *Messoclemmys vanderhaegei* (Testudines: Chelidae). Herpetological Conservation and Biology. 13: 355-365.
- Smith, H.M. y Smith, R.B. (1979). Synopsis of the Herpetofauna of Mexico: Guide to Mexican turtles: Bibliographic addendum III, Volume VI (1st Edition). Coopersburg: John Johnson.

- Soria-Guzmán, L.F. (2016). Determinación e inventario de tortugas del género *Trachemys* (Emydidae) del Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala UNAM y elaboración de una clave dicotómica. [Tesis de Licenciatura]. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. 50 p.
- Thomas, T.M., Granatosky, M.C., Bourque, J.R., Krysko, K.L., Moler, P.E., Gamble, T., Suarez, E., Deone, E., Enge, K.M. y Roman, J. (2014). Taxonomic assessment of alligator snapping turtles (Chelydridae: *Machrochelys*), with the description of two new species from the southeastern United States. *Zootaxa*. 3786: 141-165.
- Valdez-Villavicencio, J.H., Peralta-García, A. y Guillen-González, J.A. (2016). Nueva población de la tortuga de poza del suroeste *Emys pallida* en el desierto central de Baja California, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87: 264-266.
- Van Dijk, P.P., Iverson, J.B., Rhodin, A.G.J., Shaffer, H.B. y Bour, R. (2014). Turtles of the world, 7th edition: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation status. *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises. Chelonian Research Monographs*. 5: 329-479.
- Zenteno-Ruíz, C.E., Barba-Macías, E., Bello-Gutiérrez, J. y Ochoa-Gaona, S. (2010). Caracterización espacio-temporal del hábitat y presencia de *Dermatemys mawii* (Testudines: Dermatemydidae) en la cuenca de Grijalva-Usumacinta, Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*. 58: 1247-1260.

CAPÍTULO II

TÉCNICA CITOLÓGICA NOVEDOSA PARA EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS EN LAS TORTUGAS TROPICALES *Trachemys venusta venusta*, *Staurotypus triporcatus* Y *Rhinoclemmys areolata*

Javier Hernández-Guzmán¹, Viridiana Peraza-Gómez², Manuel Pérez-de la Cruz¹, Magdiel, Torres-de la Cruz¹, Arkady Uscanga-Martínez³ & Lenin Arias-Rodríguez¹

Resumen: Las tortugas son organismos con alta vulnerabilidad por el impacto en los ecosistemas y falta de conocimiento biológico. Los estudios hematológicos en los quelonios, son limitados por la carencia de técnicas-procedimientos específicos; por ello, se adoptan metodologías que no siempre resultan las apropiadas. Se compararon variaciones de la concentración de fijadores y del colorante Giemsa vs tiempos de exposición, sobre frotis sanguíneos de *Trachemys venusta venusta*, *Staurotypus triporcatus* y *Rhinoclemmys areolata*. La comparación de metanol absoluto (99.8%) vs etanol desnaturalizado (70%), se realizó con exposición de 0.5, 1.0, 5.0 y 10 min. En los ensayos de tinción con Giemsa (10%), se utilizó la exposición de 1, 5, 10 y 20 min y en los de Giemsa solución madre la tinción de 5, 10, 20 y 30 s. Los resultados muestran, que el incremento del tiempo de exposición al metanol incrementa significativamente las células con daño en membrana y estructura celular. En las muestras con etanol, se observaron bajos registros de atrofia. Durante la tinción, se observó descenso significativo de eritrocitos sin daño en la membrana, con la Giemsa al 10% y el incremento de la tinción. Con la solución madre de Giemsa, hubo incremento de células sin daño. El mejor fijador, fue el etanol desnaturalizado y la tinción recomendada es empleando tiempos de tinción cortos con Giemsa en solución madre. Con el método recomendado, será posible obtener células sanguíneas de alta calidad para estudios en ciencia básica, aplicada y en prácticas clínicas.

Palabras clave: Hematología, eritrocitos, metanol, etanol, tortugas dulceacuícolas.

¹División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa- Cárdenas Km. 0.5 S/N, Entronque a Bosques de Saloya. CP. 86150, Villahermosa, Tabasco, México.

²Unidad Académica Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Universidad Autónoma de Nayarit, Bahía Matanchén Km. 12, Carretera a los Cocos, CP. 63740, San Blas, Nayarit, México.

³Centro de Investigaciones Costeras, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Av. Juan José Calzada s/n, Col. Evolución, CP. 30500, Tonalá, Chiapas, México.

Publicado en: Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. Vol. 12, Número 1. <https://doi.org/10.19136/era.a12n1.4103>

Nombre de la Editorial: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Fecha de publicación: 04 de abril del 2025

2.0 TÉCNICA CITOLÓGICA NOVEDOSA PARA EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS EN LAS TORTUGAS TROPICALES *Trachemys venusta venusta*, *Staurotypus triporcatus* Y *Rhinoclemmys areolata*

Abstract: Tropical turtles are one of the groups of vertebrates with the greatest vulnerability in their natural environments. An experimental analysis was carried out using as a biological model three species of tropical freshwater turtles, *Trachemys venusta venusta*, *Staurotypus triporcatus* and *Rhinoclemmys areolata* based on two study phases, to identify the best method of fixation and staining of blood smears. The first consisting of a comparison of fixative (99.8% absolute methanol) vs denatured ethanol with denatonium benzoate (0.7 mg 100 mL) at 4 °C; applying exposure treatments for 0.5, 1, 5 and 10 min + Control in both fixers, and the second, consisting of a comparison of two staining methods: Giemsa 10% with treatments of 1, 5, 10 and 20 min + Control vs mother Giemsa with treatments 5, 10, 20 and 30 s + Control. In the first experiment, the number of erythrocytes with damage to the cell membrane by absolute methanol ranged from 12 erythrocytes from 0.5 min to 3108 erythrocytes at 10 min in *T. v. venusta*. In another species, 19 atrophied erythrocytes were identified from 0.5 min and 1 254 atrophied erythrocytes at 10 min in *S. triporcatus*; and 134 atrophied erythrocytes after 1 min and 1 470 atrophied erythrocytes after 10 min in *R. areolata*. The samples treated with denatured ethanol showed low records of atrophied erythrocytes in the three species of turtles with significant differences in Dunn's test $P \leq 0.001$. The second experiment based on staining, was characterized by presenting a decrease in the number of healthy erythrocytes (without damage to the cell membrane) using Giemsa 10% in the three species of turtles; of 234 erythrocytes from 1 minute of exposure to 0 atrophied erythrocytes at 10 and 20 min of exposure to the dye in *T. v. venusta*; of 246 erythrocytes after 1 min of exposure to 0 erythrocytes in 20 min of exposure to the dye in *S. triporcatus* and of 641 erythrocytes after 1 min of exposure to 0 erythrocytes in 20 min of exposure in *R. areolata*. However, stem Giemsa staining revealed a higher number of healthy cells, with significant differences in Dunn's test $P \leq 0.001$ in the three species of turtles. The best fixation method in tropical freshwater turtle cells in this study was denatured ethanol and the best staining method was using mother Giemsa.

Key words: Hematology; erythrocytes; methanol; ethanol; freshwater turtles.

2.1 INTRODUCCIÓN

Las tortugas o quelonios (Testudines), son un grupo de vertebrados acuáticos y terrestres, ampliamente distribuidos en el mundo, habitando desde los arroyos, charcas, ríos, lagunas, mares, hasta los desiertos, bosques y selvas tropicales. A pesar de la diversidad de ecosistemas, donde se pueden encontrar las maravillosas tortugas; los estudios biológicos y ecológicos en el orden Testudines, es muy reducido, y al parecer, solo el grupo de las tortugas marinas ha sido el que más se ha estudiado; en diferentes disciplinas como son ecología, reproducción, genética; incluyendo los estudios celulares e intracelulares de sangre periférica (Anderson et al., 2011; Flower et al., 2018; Ramakrishnan et al., 2018; Sinaei et al., 2019). Lo anterior, debido al desarrollo creciente de proyectos de ecología y conservación, en zonas costeras donde se distribuyen y se reproducen tales especies (Macíp-Ríos et al., 2015; García-Grajales et al., 2017). En la mayoría de las tortugas dulceacuícolas registradas, la información científica es reducida, básicamente la concerniente a la historia natural y biología básica (Macíp-Ríos et al., 2015). Un caso excepcional, es el de la tortuga orejas rojas o (*Trachemys scripta*), especie en la que se han realizado diversos estudios de biología, entre los que destacan los de citología hemática (Martínez-Silvestre & Cuenca, 2011; Allender & Mitchell, 2013; Carrascal-Velásquez et al., 2014; Hernández et al., 2017; Hadžimusić et al., 2020). En el mundo hay aproximadamente 352 especies de tortugas, siendo 345 especies son de origen dulceacuícola y terrestre; y siete son especies marinas (Rhodin et al., 2021); del total de registros 61 taxon (tortugas de agua dulce y terrestres) están presentes en México distribuidos en 45 especies, 13 géneros y siete familias (Macíp-Ríos et al., 2015). En la región tropical del sureste mexicano, que comparte características biogeográficas con algunos países de Centroamérica (Guatemala, Belice, El Salvador y Honduras), existen nueve especies integradas en siete géneros, *Kinosternon*, *Staurotypus*, *Claudius*, *Trachemys*, *Dermatemys*, *Rhinoclemys* y *Chelydra* (Flores-Villela & García-Vázquez, 2014; Rhodin et al., 2021); lamentablemente cada una de ellas está en diferentes estatus de conservación de acuerdo con la norma oficial mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) y la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2021). En estas especies, se han realizado y documentado pocos estudios formales, limitándose al conocimiento de la alimentación, distribución geográfica, fisiología, citogenética, manejo, parasitología y reproducción (Arias-Rodriguez et al., 2019). Sin

embargo, se ha evidenciado que los programas de conservación, requieren de amplio conocimiento de la biología básica de las especies sujetas a manejo; en dicho contexto los estudios hematológicos son importantes de considerar, dado que se emplean básicamente para el diagnóstico de enfermedades (Zhang et al., 2011; Corrales-Ramírez & Caycedo-Lozano, 2020), así también para el análisis de otros atributos fisiológicos, como son el estrés, daño celular, nivel de ploidía, contenido genético o genómico, entre otros atributos celulares de importancia biológica (Hadžimusić et al., 2020; Machado et al., 2020; Radisic et al., 2020). No obstante, estas metodologías han sido desarrolladas a partir de estándares para humanos y otros mamíferos como los ratones, vacas, caballos, etc (Perpiñán & Sánchez, 2009; Campbell, 2015). Algunas técnicas han sido adaptadas para su aplicación en el estudio hematológico en pequeños vertebrados; a través de diversos campos como la acuicultura en amplia variedad de especies acuáticas y en zootecnia para organismos herpetológicos, aves y mamíferos (Stacy et al., 2011; Zhang et al., 2011). Dada la importancia de los estudios hematológicos, para la comprensión de la estructura y dinámica de las células sanguíneas, las adaptaciones de dichas metodologías no siempre resultan con el procedimiento más apropiado, lo que resulta en detrimento del tiempo, de recursos económicos y de falsas interpretaciones. Actualmente, no hay metodologías hematológicas específicas para los Testudines o tortugas, ya que los métodos estándar utilizados parecen ser adecuados únicamente para observar y evaluar la morfología celular. Sin embargo, la calidad de las tinciones, basado en las observaciones de las imágenes publicadas, no es óptima, debido a los artefactos originados por las propiedades químicas, físicas y bioquímicas de las células en cada especie (Dessauer, 1970; Snyder & Sheafor, 1999; Arian & Çiçek, 2010; 2014). Lo anterior ha evidenciado la escasez de estudios hematológicos en las tortugas, principalmente en las especies dulceacuícolas de origen tropical. Esta situación ha motivado, a través del presente estudio, el diseño comparativo de los métodos hematológicos más utilizados en vertebrados, con el objetivo de establecer un procedimiento específico y económicamente viable para especies dulceacuícolas. Para ello, se emplearon como modelo biológico a tres especies de tortugas nativas del sureste mexicano, la jicotea *Trachemys venusta venusta*, el tres lomos *Staurotypus triporcatus* y la mojina *Rhinoclemmys areolata*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Área de estudio, recolecta y marcaje

Los especímenes fueron recolectados por observación visual del entorno silvestre en acuerdo con el siguiente esquema: las tortugas jicotea *T. v. venusta* (12 hembras y 10 machos), el tres lomos *S. triporcatus* (ocho hembras y cuatro machos) y la mojina *R. areolata* (9 hembras y 5 machos), fueron capturados por observación y tomados manualmente de las lagunas del Pueblo y Huapacal de la Villa Luis Gil Pérez del municipio del Centro, de los márgenes de los pantanos de la Villa Sánchez Magallanes, municipio de Cárdenas y de los humedales del poblado Federico Álvarez, municipio de Jonuta, respectivamente, todas las localidades del estado de Tabasco, México. La recolecta de los ejemplares en vida silvestre se llevó a cabo con el permiso federal de la SEMARNAT (SGPA/DGVS/04315). Los ejemplares se mantuvieron vivos durante y después de la investigación, y en condiciones óptimas de mantenimiento, calidad de agua y alimentación en las Instalaciones del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la UJAT. Después del proceso de aclimatación y reducción de estrés, todos los individuos (48 tortugas) de las nueve especies fueron debidamente marcados con un código individual para cada ejemplar. La identificación taxonómica se basó en la nomenclatura de Legler y Vogt (2013), Ernst y Barbour (1989), Smith y Smith (1979) y atendiendo la última actualización en taxonomía, sinonimia, distribución y estatus de conservación de todas las especies de tortugas en el mundo de Rhodin et al. (2021). Este proyecto de investigación fue revisado y aceptado por la Comisión Institucional de Ética en Investigación (Folio: 0985) de la UJAT, en México. Se dio cumplimiento a las Normas Oficiales Mexicanas: NOM-059-SEMARNAT-2010, para aquellas especies con estatus de protección: Sujeta a protección especial “Pr”, Amenazadas “A” y en Peligro de extinción “P” (SEMARNAT, 2019); así como cumplimiento a las normas NOM-126-ECOL-2000 (SEMARNAT, 2001a) y NOM-062-ZOO-1999 (SEMARNAT, 2001b).

2.2.2. Extracción de sangre y extendido celular

La sangre periférica se extrajo de la vena coccígea, desinfectando la región terminal de la cola con algodón humedecido de alcohol etílico al 70% y en dependencia del peso de cada espécimen; se empleó jeringas estériles de 0.5 ml para organismos con pesos entre 300-

900 gr, jeringas de 1 ml para especímenes con peso de uno a dos kg y de 3 ml para organismos con pesos mayores a los dos y hasta los seis kg, extrayendo máximo 300 microlitros (μ l) (0.3 ml) de sangre por cada tortuga. Inmediatamente, se colocó una gota (20 μ l aproximadamente) de sangre sobre cada portaobjeto (45 portaobjetos por cada espécimen) limpios y estériles, luego fue extendida suave y homogéneamente evitando dañar las células, secando cada extendido celular o frotis al aire a temperatura ambiente (28.0 ± 0.5 °C) por 60 min.

2.2.3. Fijado post-frotis (Fase experimental I)

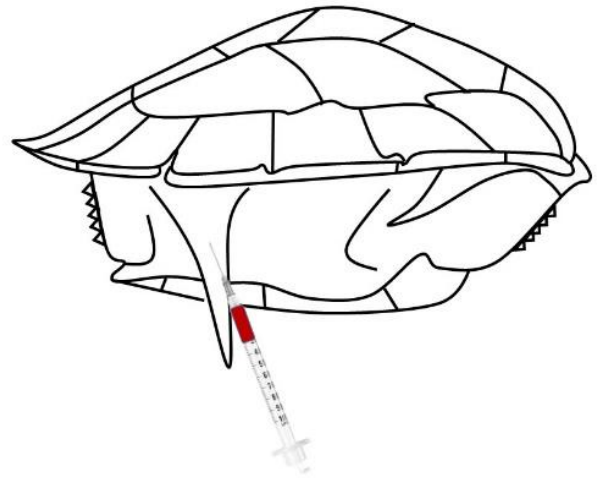
Las muestras control, consistieron en cinco frotis sanguíneos sin tratamiento de fijado, las cuales fueron analizadas inmediatamente después del secado de los extendidos sanguíneos. Para experimentar el efecto del tiempo de fijado, se prepararon dos fijadores, el metanol absoluto al 99.8% y el fijador elaborado con etanol desnaturalizado con benzoato de denatonio (0.7 mg/100 ml), ambos mantenidos a 4 °C (Figura 5). Posteriormente, los cinco frotis sanguíneos por tratamiento fueron sumergidos a los tiempos (o tratamientos) de exposición de: 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 min. Luego, fueron secados a 26 ± 1.0 °C sobre una bandeja de polipropileno, extrayendo cuidadosamente el exceso del fijador (metanol absoluto y etanol desnaturalizado).

2.2.4. Tinción post-frotis (Fase experimental II)

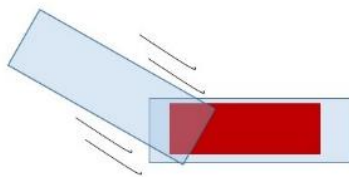
Las muestras control, fueron analizadas inmediatamente después del secado del frotis. Posteriormente, las muestras que fueron fijadas, se dejaron envejecer a temperatura ambiente (28.0 °C) durante 12 h previo a la aplicación del colorante. Subsiguientemente, se aplicó la tinción con Giemsa al 10% y con Giemsa en solución madre. La Giemsa al 10% o tinción de Romanosky a 4.0 °C, se empleó con modificaciones del protocolo de Campbell (2015), utilizando buffer de fosfatos a pH 7.0 y las preparaciones citológicas fueron teñidas por 1.0, 5.0, 10.0 y 20.0 min, respectivamente. Para la tinción con Giemsa en solución madre a 4.0 °C (sin diluyente), las muestras citológicas respectivas se expusieron a 5.0, 10.0, 20.0 y 30.0 s de tinción con el colorante. Transcurridos los tiempos de tinción, a cada una de las muestras, se les retiró el exceso de colorante colocando las preparaciones citológicas en posición vertical sobre un recipiente cilíndrico de polipropileno, luego se aplicó agua destilada para lavar los restos de colorante y permitir el escurrido y secado rápido (Figura 5).

1 Muestra de sangre

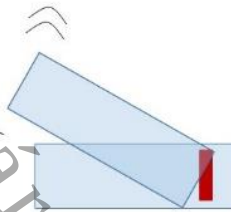
- Se recomienda la extracción sanguínea de la vena coccígea.



1. Colocar una mínima gota de sangre



2. Extender la gota a lo largo del portaobjeto



3. Extender a modo de apreciar una película delgada del tejido sanguíneo



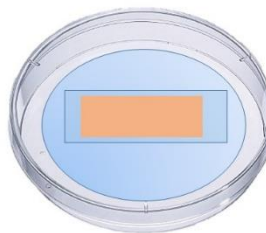
4. Dejar secar a temperatura ambiente

2 Frotis

Tratamiento con metanol absoluto al 50%

3

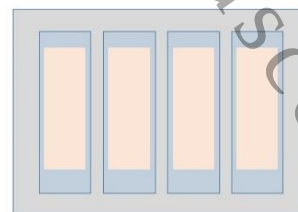
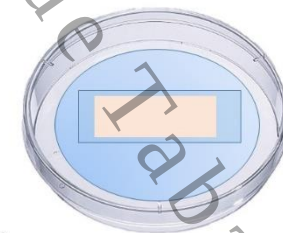
1. Verter la muestra en la solución por 2 min.



3. Extraer la muestra de la solución y dejar secar



2. Transcurrido el tiempo, se eliminarán impurezas



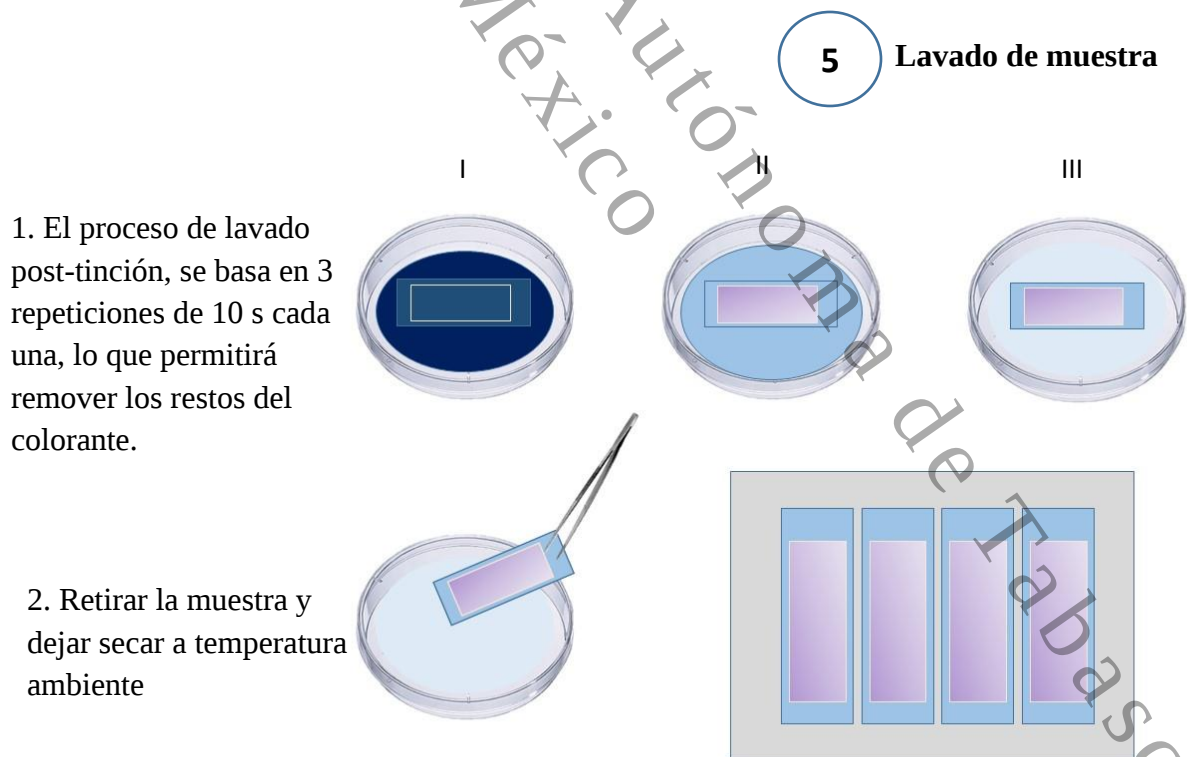
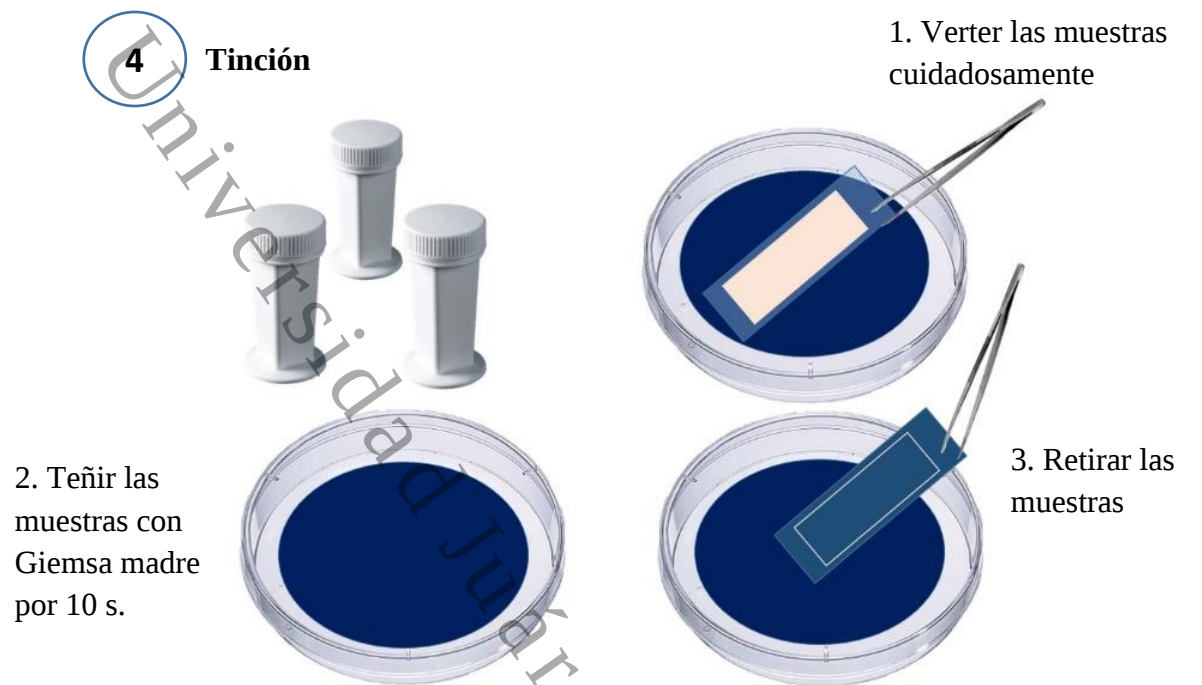


Figura 5. Procedimiento para la obtención celular y análisis nuclear por frotis sanguíneo.

2.2.5. Microscopía óptica y criterios de la calidad celular

Los campos hematológicos, fueron analizados utilizando las herramientas del módulo de contraste de fases en campo claro/oscuro y seleccionados al azar en el microscopio AxioScope A1 (Carl Zeiss®) con el objetivo 10X+1.25X del Optovar (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011). Después, se fotodigitalizaron con el módulo de adquisición de imágenes de la cámara AxioCam ERc5s con el objetivo 40X+1.25X del Optovar. Las imágenes procedentes de la fase experimental I, se analizaron detalladamente con las herramientas digitales para el procesamiento posterior y filtrado mediante canales fluorescentes simulados del programa ZEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011). Las imágenes procedentes de la fase experimental II, se analizaron detalladamente con las herramientas digitales para el procesamiento posterior y filtrado de canales en campo claro de los colores reales basado en los patrones de tinción de la Giemsa con el programa ZEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011).

Los eritrocitos se evaluaron y contabilizaron, tomando dos criterios esenciales en la integridad de la membrana celular:

- a) Daño en la membrana y citoplasma celular (DMC): Son aquellas células eritrocitarias que manifiestan alteraciones morfológicas o pérdida de simetría como son contracción, fractura del citoplasma, fractura de la membrana y pérdida parcial o total de la integridad de la membrana celular. En estas dispersiones, las células y el perímetro, muestran presencia de residuos e impurezas de origen orgánico y biológico.
- b) Sin daño en la membrana y citoplasma celular (SMC): Son aquellas células eritrocitarias que no presentan alteraciones morfológicas del citoplasma, de la membrana y mantienen simetría celular integra. Además, la coloración del área nuclear, es homogénea con tinción en tonalidad púrpura o azul intenso. Por otro lado, las dispersiones celulares y perímetro, deben observarse (externamente) libres de impurezas (química o biológica) como estructuras refractarias, residuos de la tinción y bacterias.

2.2.6. Análisis de datos y estadísticos

Los valores obtenidos, se registraron en bases de datos individuales y les fueron calculados, el promedio; y la desviación estándar (D.E.) con el empleo del programa Excel

para Windows (Microsoft® 2022). Los porcentajes, fueron calculados basados en la siguiente fórmula: $Pcs = Ncs / Ntc (100)$; donde Pcs = Porcentaje de células sin daño en la membrana celular. Ncs = Número de células sin daño en la membrana celular por espécimen. Ntc = Número total de células por espécimen.

Los porcentajes, fueron analizados en acuerdo al cumplimiento de las pruebas de homogeneidad y homocedasticidad con análisis de Kruskal-Wallis (K-W); y en el caso de observarse diferencias significativas (cuando $P \leq 0.05$), se aplicó la prueba de Dunn's a $P \leq 0.05$ (Zar, 1984), en todos los casos se empleó el programa SigmaPlot® (12.3 de Systat Software Inc®).

2.3 RESULTADOS

2.3.1. Fijado post-frotis o Fase experimental I

El fijado de los frotis sanguíneos con etanol desnaturalizado y metanol absoluto, permitió el análisis total de 57,626 células eritrocitarias; de las cuales 26,852 correspondieron a los eritrocitos de la jicotea *T. v. venusta*, 15,835 células de la tortuga tres lomos *S. triporcatus* y 14,939 eritrocitos de la tortuga mojina *R. areolata* (Tabla 2). En la tortuga *T. v. venusta* se registraron por efecto del empleo del metanol absoluto desde 12 células con daño en la membrana celular, con tiempos de exposición de 0.5 min y hasta 3108 eritrocitos atrofiados por exposición al metanol por 10 min. Las células que no mostraron daños en la morfología de la membrana celular, se mostraron con frecuencia baja de 329 eritrocitos a los 10 min de exposición. En *S. triporcatus* o tortuga tres lomos, se identificaron 19 eritrocitos con daños en la membrana celular expuestos a metanol absoluto durante 0.5 min y hasta 1270 eritrocitos dañados con el tiempo de exposición de 5 min. En la tortuga tres lomos, las células que se observaron sin daño en la membrana celular, se notaron con registros bajos de 78 eritrocitos a 10 min de exposición al metanol absoluto. En el caso particular de la mojina o (*R. areolata*), se analizaron muestras celulares sin daños en la membrana celular en el grupo control y a los 0.5 min de exposición al metanol absoluto. No obstante, se registraron hasta 1470 eritrocitos atrofiados por exposición de 10 min. La frecuencia más baja de eritrocitos sanos se observó a los 10 min, con solo 174 células, lo que representó el 10.5% del total (Tabla 2).

Con el empleo del metanol absoluto, se observó en relación con los cuatro tiempos de exposición (0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 min) en las tres especies analizadas, incremento significativo ($P=0.001$) y progresivo del número de células con daño en la membrana celular (**Dmc**) (Tabla 2). Tales resultados se vieron reflejados también, con el decremento significativo ($P=0.001$) gradual en los porcentajes de células sin daño en la membrana celular (**Smc**), cuando el metanol fue empleado como fijador de las células sanguíneas de las tres especies ensayadas y en cualquiera de los tiempos de exposición comparados (Figura 6A, 6C y 6E). La reducción significativa ($P=0.001$) de los daños sobre la membrana celular de las tres especies analizadas, se observaron cuando el etanol como fijador fue empleado 0.5 min (30 s), siendo una observación similar al compararse con los resultados observados en las muestras control; debido a que ambos formaron un grupo estadístico similar o grupo “a” (Tabla 2, Figura 6A, 6C y 6E). En el caso de los tratamientos de exposición correspondientes a 1 min, 5 min y 10 min, estos integraron los grupos estadísticos “b, c y d” que fueron congruentes con el incremento significativo ($P=0.001$) de los porcentajes de células con daños en la membrana celular (Tabla 2, Figura 6A, 6C y 6E).

Por otro lado, los frotis sanguíneos de las tres especies de tortugas, que fueron fijados con etanol desnaturalizado mostraron reducidos efectos en las células eritrocitarias con observaciones de ocurrencias de daños en la membrana celular desde cero (0%) y hasta tres (0.11%) células de la tortuga *T. v. venusta*, de 0 (0%) a 5 (0.29%) células en *S. triporcatus* y de 0 (0%) a 12 (0.79%) células en *R. areolata*, incluso en los tiempos de exposición prolongadas con 5 a 10 min. De esta forma, el análisis estadístico manifestó que no hay diferencias significativas ($P=0.06$) en los tiempos (0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 min) de exposición al etanol en las muestras de *T. v. venusta* debido a que el número y porcentajes (%) de células sanas o sin daños en la membrana celular en *T. v. venusta*, fueron elevados ($P=0.06$) (en contraste con la reducción de los porcentajes de células dañadas), desde 2502 (100%), 2408 (99.9%), 2619 (99.8%), 2446 (99.9%) eritrocitos que fueron expuestos al etanol desnaturalizado por 0.5 min, 1 min, 5 min y 10 min, respectivamente. Mientras que, en la tortuga *S. triporcatus* no se observó células eritrocitarias dañadas (con frecuencia de cero) en las muestras sanguíneas del control, de 0.5 min y 1.0 min de exposición al etanol. En las muestras que fueron expuestas al etanol 5.0 (0.20%) y 10 (0.05%) min se notó reducido número y porcentajes de células con daños en la membrana celular. Tales resultados

contrastaron con el incremento (desde 100% y hasta 99.7%) y observación de eritrocitos con atributos de células sanas o sin daños en la membrana y estructura celular (intracelular y extracelular), que fueron expuestas al tiempo de 5 y 10 min, comparativamente. Cuando fueron cotejados por el análisis estadístico (K-W), manifestó la ausencia de diferencias significativas ($P=0.06$) en los cuatro tiempos de exposición analizados.

En la tortuga mojina *R. areolata*, las muestras control y aquellas sometidas a 0.5 min y 1 min de exposición al etanol desnaturalizado, mostraron ausencia de células con daños en la membrana y estructura celular (intracelular y extracelular) encontraste se observó en todos los casos 100% de células sanas o con ausencia de daños en la estructura intracelular; y extracelular. En la mojina, al evaluarse los efectos de exposición al etanol con 5 y 10 min, se observó frecuencia de células con daños muy reducidos desde 7 (0.47%) y hasta 12 (0.79%) células afectadas por los tratamientos. En todos los casos la exposición de las células sanguíneas de *R. areolata* al etanol, mostraron que no hay diferencias significativas entre los tratamientos comparados.

Tabla 2. Número de células con daño y sin daño en la membrana celular, que fueron expuestas a diferentes tiempos de exposición con metanol absoluto y etanol desnaturalizado.

Medio fijador: Metanol absoluto									
T.e.	<i>T. v. venusta</i>			<i>S. triporcatus</i>			<i>R. areolata</i>		
	Dmc	Smc	Total	Dmc	Smc	Total	Dmc	Smc	Total
Control	0	2504 ^a	2504	0	1508 ^a	1508	0	1394 ^a	1394
0.5 min	12	2343 ^a	2355	19	1644 ^a	1663	0	1563 ^a	1563
1 min	181	2927 ^b	3108	284	1672 ^b	1956	134	1386 ^a	1520
5 min	1248	1804 ^c	3052	1270	270 ^c	1540	1078	303 ^b	1381
10 min	3108	329 ^d	3347	1254	78 ^d	1332	1470	174 ^c	1644
Total, de células:			14366			7999			7502
Medio fijador: Etanol desnaturalizado									
	<i>T. v. venusta</i>			<i>S. triporcatus</i>			<i>R. areolata</i>		
	Dmc	Smc	Total	Dmc	Smc	Total	Dmc	Smc	Total
Control	0	2504 ^a	2504	0	1509 ^a	1509	0	1477 ^a	1477
0.5 min	0	2502 ^a	2502	0	1598 ^a	1598	0	1492 ^a	1492
1 min	2	2408 ^a	2410	0	1575 ^a	1575	0	1481 ^a	1481
5 min	3	2619 ^a	2622	3	1460 ^a	1463	7	1474 ^a	1481
10 min	2	2446 ^a	2448	5	1686 ^a	1691	12	1494 ^a	1506
Total, de células:			12486			7836			7437

T.e.= Tratamiento experimental, Dmc= Daño en la membrana celular, Smc= Sin daño en la membrana celular, min= minutos. Literales iguales en cada gráfico, representa que no hay diferencias significativas con $P \leq 0.05$ y en caso contrario las diferencias existen.

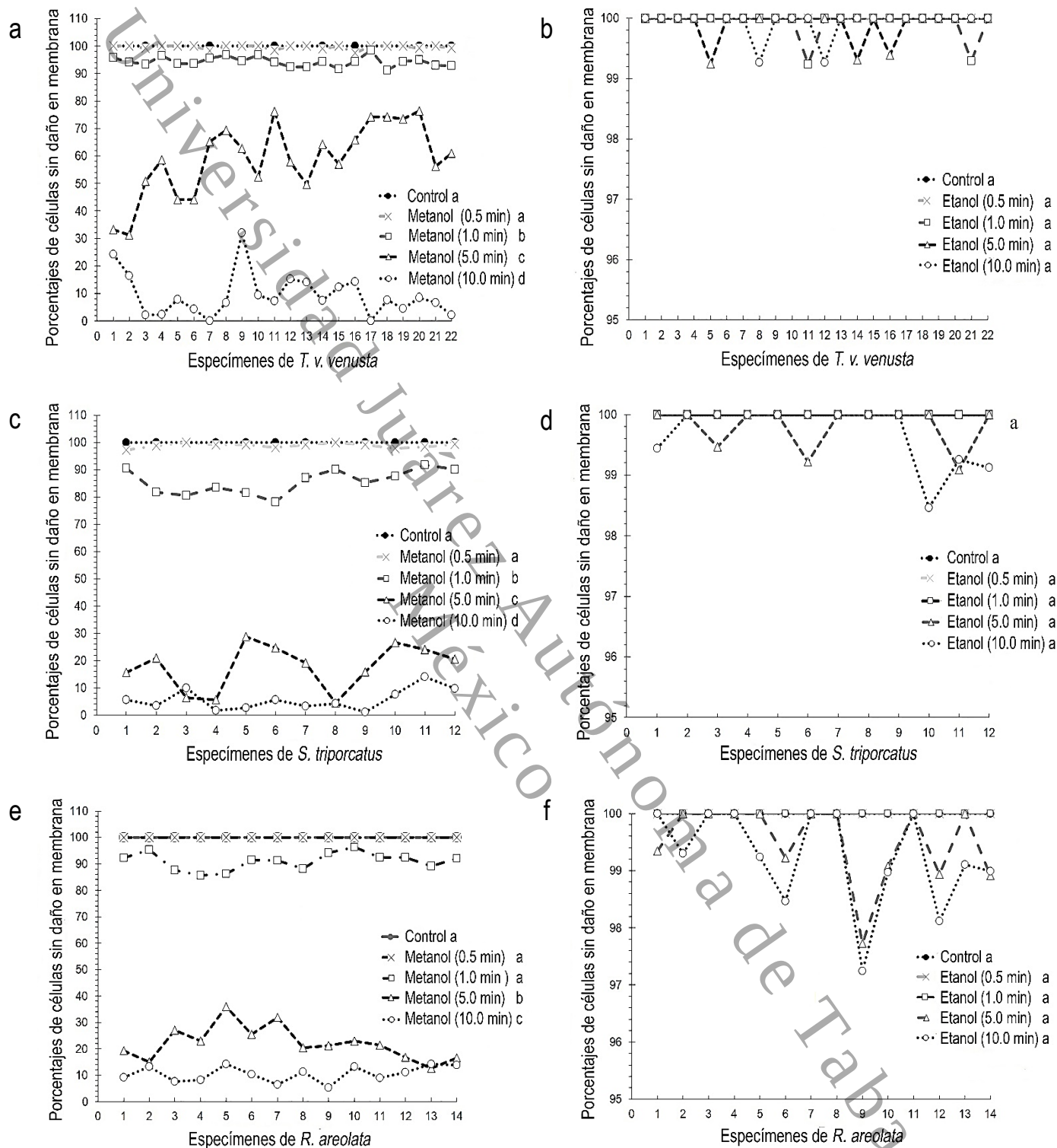


Figura 6. Comportamiento de la membrana celular (eritrocitos sin daños en porcentajes) expuestos a metanol y etanol en las tortugas *T. v. venusta* (a, b), *S. triporcatus* (c, d) y *R. areolata* (e, f). Literales iguales en cada gráfico, representa que no hay diferencias significativas con $P \leq 0.05$ y en caso contrario las diferencias existen.

2.3.2. Tinción post-frotis con Giemsa madre y Giemsa 10 % (Fase experimental II)

La segunda fase experimental se basó en el análisis de 54191 células eritrocitarias, correspondiendo a 24239 eritrocitos de *T. v. venusta*, 15161 eritrocitos de *S. triporcatus* y 14791 células rojas de *R. areolata* (Tabla 3, Figura 7). En dicho sentido, en la tortuga *T. v. venusta*, se identificó incremento significativamente elevado del número y porcentajes de eritrocitos atrofiados de la membrana celular desde cero en las muestras control y hasta 2336 células (100%); en contraste con la reducción significativa del número y porcentajes de células sin daño en la membrana celular desde 2504 (100%) y hasta de cero (0%), todo ello acorde con el incremento de los tiempos (1, 5, 10 y 20 min) de tinción o exposición al colorante Giemsa al 10% (Tabla 3, Figura 7).

En la tortuga *S. triporcatus*, se identificó ausencia (cero) de células dañadas en las muestras analizadas del control, mientras se notó 1262 (83.6%) eritrocitos atrofiados o con daño en la membrana celular (DMC) después de que fueran teñidos o expuestos 1 min a la tinción de Giemsa al 10%; así también a los 5 min de exposición 1171 (75.5%) células fueron observadas con DMC, con exposición de 10 min 1362 (97.0%) eritrocitos se observaron atrofiados y a los 20 min de exposición o tinción con Giemsa al 10%; 1339 eritrocitos (100%) se registraron con DMC. En los tratamientos analizados en *S. triporcatus*, se observó decremento significativo del número y de los porcentajes de células sin daño (CMC) en la membrana celular desde 242 (16.3%) células con 1 min de exposición, 376 (24.2%) con 1 min, 39 (2.78%) eritrocitos con 10 min y cero células (0.0%) (Tabla 3, Figura 7). Por otro lado, en la tortuga *R. areolata* se obtuvieron cero registros o ausencia de daños en la membrana celular de aquellas muestras del tratamiento control, registros de 972 (60.2%) eritrocitos con daños en la membrana fueron observados con 1 min de exposición a la solución de Giemsa 10%, 914 (70.3%) células con daños se registraron a los 5 min de exposición, con 10 min de tinción 1332 (94.2%) células rojas fueron observadas con daños en la membrana celular y 1451 (100%) células dañadas se registraron con 20 min de exposición a la solución de Giemsa 10% (Tabla 3, Figura 7).

En los tratamientos con 1, 5, 10 y 20 min en *R. areolata*; se observó también decremento significativo del número y porcentajes de células sin daño en la membrana celular con el incremento del tiempo de exposición de las muestras celulares a la tinción o exposición al colorante Giemsa al 10% (Tabla 3, Figura 7). Con el análisis estadístico de Kruskal-Wallis y

la prueba a posteriori de Dunn's, en todas las especies y en todos los tratamientos de 1, 5, 10 y 20 min de tinción con Giemsa 10%, se observó diferencias significativas ($P \leq 0.001$) respecto a las observaciones en las muestras celulares del tratamiento control (Tabla 3, Figura 7).

Por otro lado, en las muestras que fueron teñidas con Giemsa en solución madre (Figura 9); las observaciones realizadas mostraron ausencia (cero=0) de eritrocitos atrofiados (o 100% de células sin daño en la membrana celular) en el tratamiento control y en las muestras del tratamiento con 5 segundos (5 s) exposición a la tinción de solución madre en las tres especies de tortugas dulceacuícolas *T. v. venusta*, *S. triporcatus* y *R. areolata* (Tabla 3, Figura 9). Por el contrario, en los extendidos celulares de las tres especies de tortugas dulceacuícolas, se observó incremento significativo ($P \leq 0.001$) del número y de los porcentajes de células con daños en la membrana celular con el incremento del periodo (10, 20 y 30 segundos) de tinción con Giemsa en solución madre (Tabla 3, Figura 8).

En la tortuga jicotea *T. v. venusta*, a los 10 s, 20 s y 30 s se registraron 11 (0.42%), 184 (7.55%) y 881 (34.3%) células respectivamente con daño en la membrana celular (Dmc). Mientras que en el tres lomos *S. triporcatus*, a los 10 s, 20 s y 30 s de tinción se observaron 41 (2.85%), 101 (5.98%) y 370 (18.7%) células con Dmc respectivamente. Así también en la tortuga mojina *R. areolata* a los 10 s, 20 s y 30 s de tinción con Giemsa en solución madre, se observaron 135 (8.68%), 317 (19.6%) y 729 (52.8%) células con daños en la membrana celular eritrocitaria respectivamente. Por el contrario, se observó incremento significativo de los porcentajes de células sin daño en la membrana y estructura celular con el decremento en los tiempos (10 s, 20 s y 30 s) de exposición al colorante Giemsa en solución madre desde 100 % de eritrocitos sin daños en membrana en el tratamiento control y a los 5 s de exposición en las tres especies de tortugas, *T. v. venusta*, *S. triporcatus* y *R. areolata*; lo cual fue comprobado al no existir diferencias significativas después de aplicar la prueba Dunn's ($P \leq 0.001$) en tales tratamientos (Tabla 3, Figura 8). Por otro lado, los tratamientos de 10 s, 20 s y 30 s con la prueba de Dunn's ($P \leq 0.001$), manifestaron diferencias significativas en relación con el resto de tratamientos.

Tabla 3. Resultados de la fase experimental II y respuesta de la estructura celular expuesta a dos métodos de tinción.

Tinción: Giemsa 10%									
<i>T. v. venusta</i>			<i>S. triporcatus</i>				<i>R. areolata</i>		
T.e.	Dmc	Smc	Total	Dmc	Smc	Total	Dmc	Smc	Total
Control	0	2504 ^a	2504	0	1450 ^a	1450	0	1441 ^a	1441
1 min	2045	234 ^b	2279	1262	246 ^b	1508	972	641 ^b	1613
5 min	2299	225 ^c	3108	1174	376 ^c	1550	914	385 ^c	1299
10 min	2275	0 ^d	2275	1362	39 ^d	1401	1332	81 ^d	1413
20 min	2336	0 ^d	2336	1339	0 ^e	1339	1451	0 ^e	1451
Total de células:			11918	7248			7217		

Tinción: Giemsa madre									
<i>T. v. venusta</i>			<i>S. triporcatus</i>				<i>R. areolata</i>		
Control	0	2504 ^a	2504	0	1402 ^a	1402	0	1373 ^a	1373
5 s	0	2237 ^a	2237	0	1411 ^a	1411	0	1490 ^a	1490
10 s	11	2577 ^b	2588	41	1396 ^b	1437	135	1419 ^b	1554
20 s	184	2251 ^c	2435	101	1586 ^c	1687	317	1294 ^c	1611
30 s	881	1676 ^d	2557	370	1606 ^d	1976	729	817 ^d	1546
Total de células:			12321	7913			7574		

T.e.= Tratamiento experimental, Dmc= Daño en membrana celular, Smc= Sin daño en membrana celular, min= minutos, s= segundos. Literales iguales en cada gráfico, representa que no hay diferencias significativas con $P \leq 0.05$ y en caso contrario las diferencias existen.

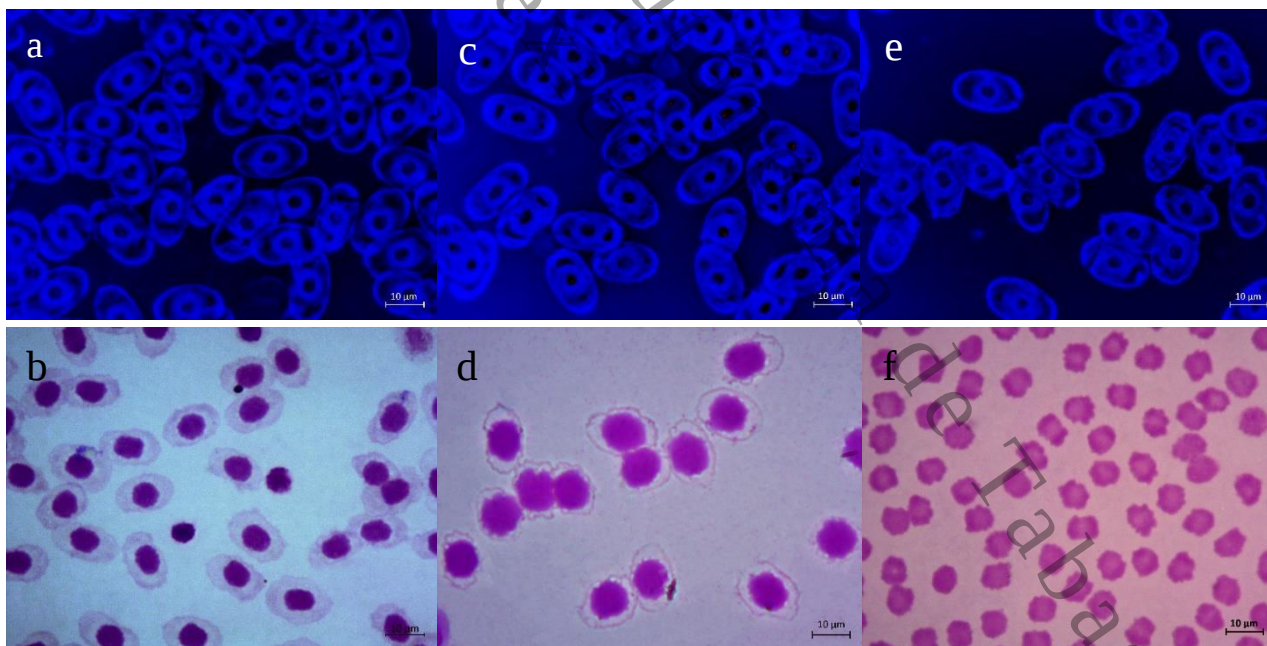


Figura 7. Células hematopoyéticas con pérdida severa de simetría en la estructura extracelular, intracelular y del citoplasma por efecto del metanol (a, c, e) y tinción con Giemsa al 10% (b, d, f) en las tortugas tropicales *T. v. venusta* (a, b), *S. triporcatus* (c, d) y *R. areolata* (e, f). La barra en cada microfotografía equivale a 10 µm.

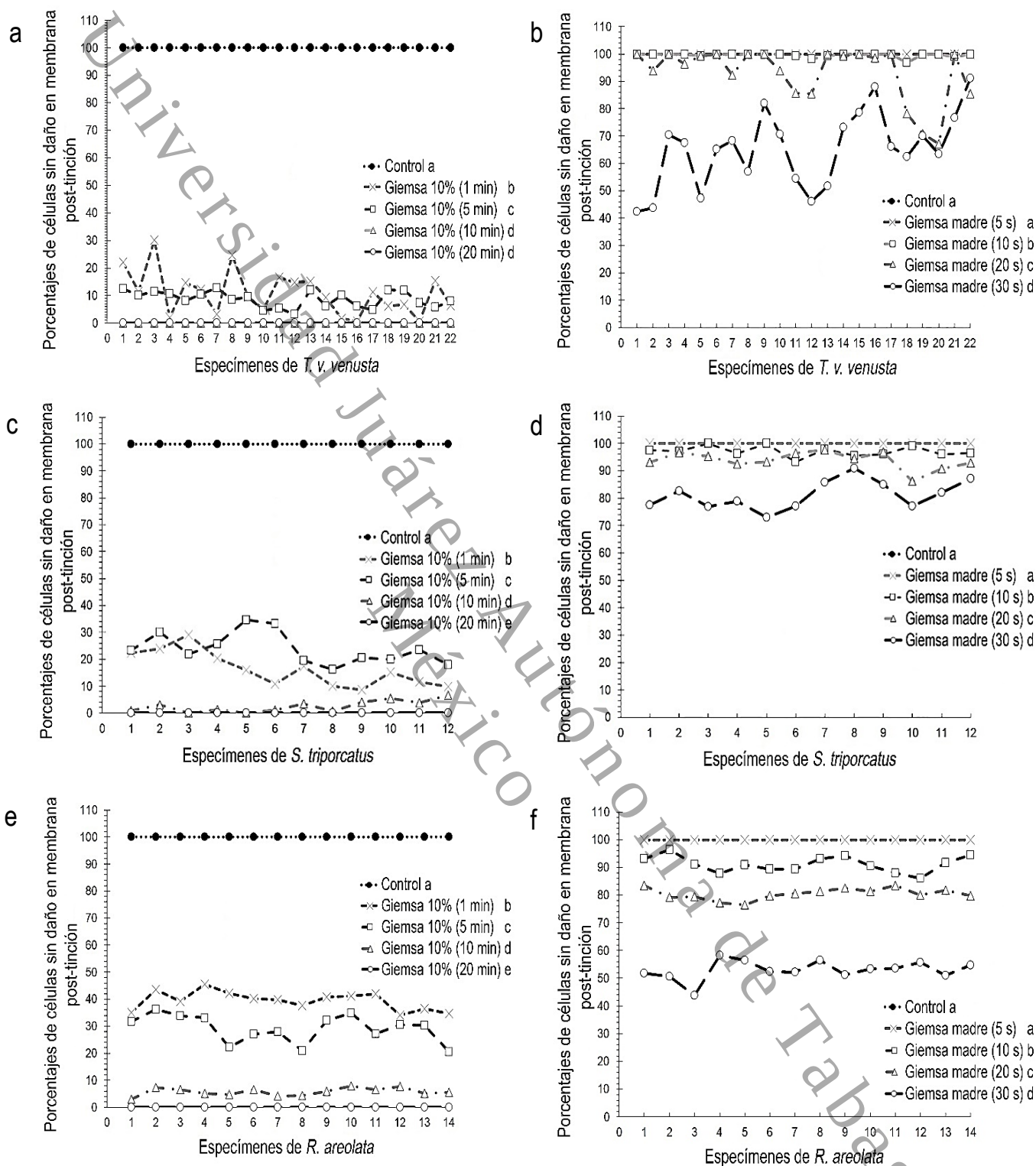


Figura 8. Comportamiento de la estructura celular eritrocitaria post-tinción (Giemsa 10% vs Giemsa madre) en *T. v. venusta* (a, b), *S. triporcatus* (c, d) y *R. areolata* (e, f). Literales iguales en cada gráfico, representa que no hay diferencias significativas con $P \leq 0.05$ y en caso contrario las diferencias existen.

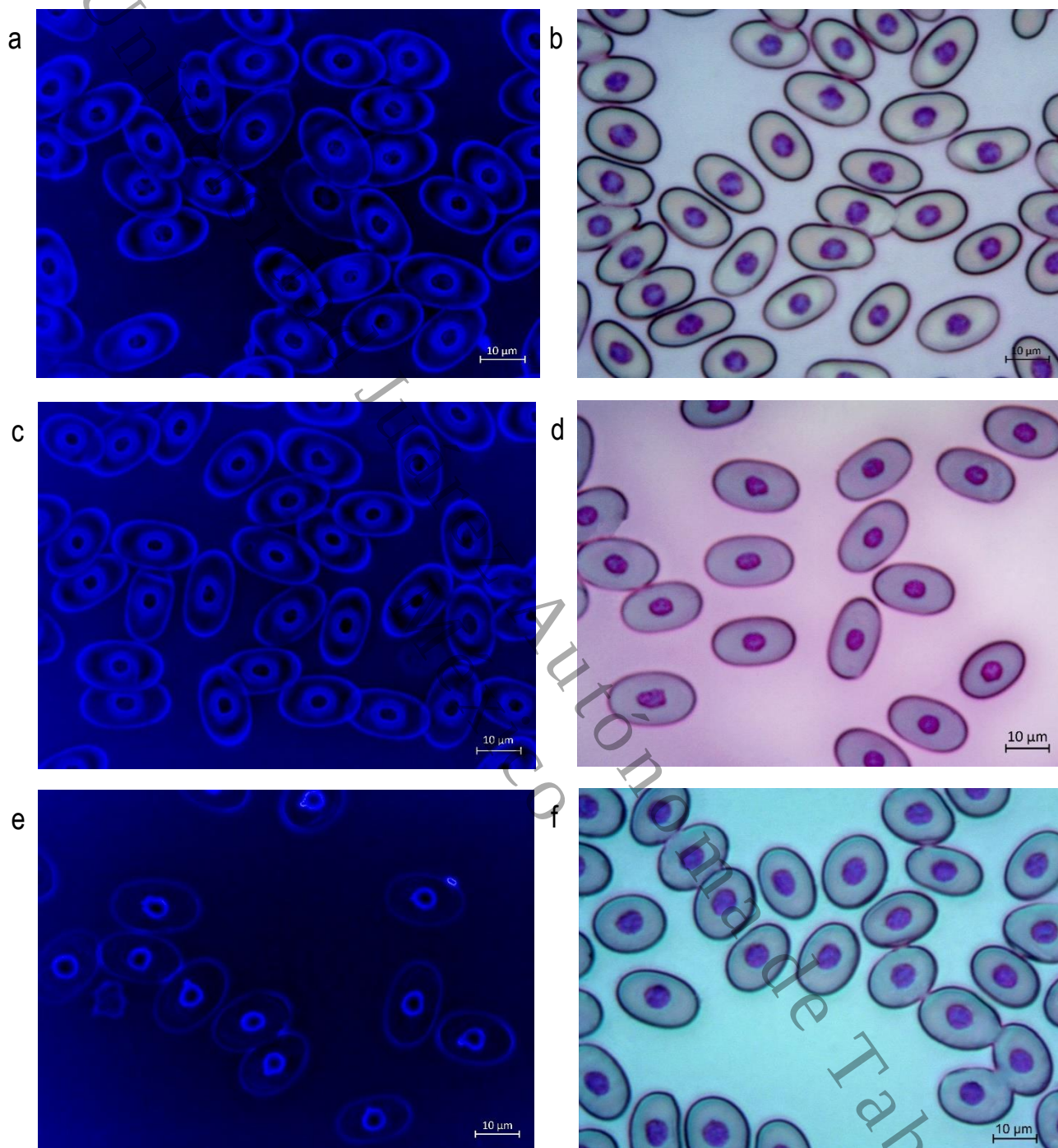


Figura 9. Células hematopoyéticas con la estructura celular integra y normal de muestras sanguíneas de tres especies de tortugas dulceacuícolas *T. v. venusta* (a, b), *S. triporcatus* (c, d) y *R. areolata* (e, f), que fueron tratadas con el mejor procedimiento de fijado (etanol desnaturalizado, 5 min) y tinción (Giemsa madre, 10 s). La barra en cada microfotografía equivale a 10 µm.

2.4. DISCUSIÓN

En el caso particular de la tinción de Giemsa diluida al 10%, además de requerir más tiempo expuesto al colorante, esta técnica tiene mayor impacto en la integridad de las membranas celulares, llegando a registrar hasta 100% de células con alguna alteración en su morfología a los 20 min de exposición en las tres especies de tortugas, y en el caso particular de *T. v. venusta*, esta condición se presentó a partir de 10 min de exposición.

Estudios previos dirigidos a la simulación de dinámica molecular de células, sostienen que la presencia de alcoholes puede causar estrés reflejados en la membrana celular, los cuales actúan como surfactantes e incrementando la interacción entre el área superficial y el número de cadenas hidrofílicas que conforman la membrana (Wittenberg et al., 2008; Rivera & Lima, 2013). Lo anterior, explica el efecto desorbador e irregularidades en el mecanismo de la membrana celular cuando son expuestos a diferentes tipos de alcoholes como metanol y el etanol (Gurtovenko & Anwar, 2009; Kaye et al., 2011; Rivera & Lima, 2013). Otros estudios en simulación de dinámica molecular entre alcoholes como el etanol y metanol sugieren que el etanol tiene mayor efecto sobre las propiedades estructurales de la membrana celular a escalas de prolongación expuesta a nanosegundos, específicamente impactando a la bicapa lipídica, ocasionando mayor fluidez y permeabilidad en su funcionalidad (Patra et al., 2006; Collin et al., 2014). Además, estudios experimentales en fármacos aplicados a células cancerígenas, apuntan que los alcoholes (etanol y metanol) tienen efectos adversos en las células, inhibiendo la proliferación celular a concentraciones elevadas, sin embargo, este efecto se reduce al disminuir las concentraciones de estos alcoholes a 0.15 y 2.5% (Nguyen et al., 2020).

También, se ha documentado que la presencia de alcoholes ocasiona deformación de la membrana celular de los eritrocitos a bajas concentraciones que van de 0.5 a 5% en metanol, 0.5 a 7% en etanol y propanol, así como 0.5 a 2% en butanol, existiendo diferentes niveles de hemólisis de acuerdo a la concentración de estos alcoholes (Sonmez et al., 2013). Dicho modelo experimental aplicado en eritrocitos, concuerda con el presente estudio a una escala de concentración más alta con etanol desnaturalizado (70%) y metanol absoluto (99.8%) expuestos a tiempo más prolongados de 0.5 a 10 min, siendo el metanol absoluto el que ocasiona mayor daño a la membrana de las células en el proceso de fijación de los frotis sanguíneos. Nuestro estudio difiere con el trabajo de Sonmez et al. (2013), donde reporta

mayor daño a la membrana celular por etanol y efecto nulo en la membrana celular por presencia de metanol, al igual que Mesquita et al. (1999), donde señala que el etanol puede llegar a producir cambios en la membrana celular y el citoesqueleto de eritrocitos por la adsorción de macromoléculas, cargas superficiales, empaquetamiento de lípidos y proteínas de la membrana y anomalías en la bomba electrolítica. Lo anterior puede deberse a técnicas experimentales distintas, ya que el estudio de Sonmez et al. (2013) fue realizado exponiendo las muestras de sangre, suspendiendo y diluyendo directamente en los alcoholes (metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol) y aplicado a células humanas, mismas que han sido estudiadas posteriormente en muestras sanguíneas de voluntarios en Corea del Sur (Lee et al., 2015).

Así mismo, las membranas celulares que reportamos en las especies *T. v. venusta*, *S. triporcatus* y *R. areolata* presentaron etapas de comportamiento bifásico, aumentando el daño a la membrana celular y después disminuyendo el daño conforme aumentaba el tiempo de exposición a los dos tipos de alcoholes (Etanol desnaturalizado y metanol absoluto), comportamiento que ha sido reportado en estudios de curvas de elongación y tensión tangencial de alcoholes en eritrocitos (Sonmez et al., 2013; Lee et al., 2015).

Por otro lado, actualmente no existen estudios que comparen la calidad de los eritrocitos teñidos y la calidad de imagen de los campos hematológicos, los cuales, se manifiestan con distintos tipos de morfología en la membrana celular de eritrocitos y otras células. Estos efectos aún no han sido caracterizados desde el punto de vista anatómico o morfológico en los eritrocitos, por lo que, solo puede compararse actualmente a células con algún tipo de deficiencia y con una asociación clínica de células humanas (Tyrrell et al., 2021). Este trabajo no aborda dicha caracterización, sin embargo, abre un paradigma para estudios posteriores en la citología experimental de las tortugas.

Sin embargo, es posible describir y comparar la calidad de las imágenes que esta nueva técnica ofrece con otros estudios hematológicos aplicado a diferentes especies, donde la membrana celular de los eritrocitos presentan anormalidades en su morfología, presumiblemente por un inadecuado método de fijación o tinción; dichas evidencias han sido publicadas de manera indirecta en diferentes especies de organismos acuáticos como los peces *Clarias batrachus*, *Heteropneustes fossilis*, *Anabas testudineus*, *Channa punctatus*, *C. striatus*, *Oreochromis niloticus*, *Labeo rohita*, *Catla catla*, *Cirrhinus mrigala*, *C. reba* y *Notopterus notopterus* (Osman et al., 2018; Acharya & Mohanty, 2019). Mientras que, en

otros estudios se pueden encontrar evidencias en microfotografías de eritrocitos teñidos incorrectamente, las cuales pueden llegar a tener baja diferenciación de coloración entre el núcleo y la membrana celular, así como alteraciones en la morfología de la membrana celular, principalmente en la tortuga *Lepidochelys olivacea* (Ramírez-Acevedo et al., 2012; Ramakrishnan et al., 2018).

En conclusión, se determinó que el etanol desnaturalizado es el medio fijador que causa el menor impacto en la membrana celular de eritrocitos con exposición a tiempo de 0.5 a 10 min en las tres especies de tortugas dulceacuícolas *T. v. venusta*, *S. triporcatus* y *R. areolata*. En la segunda fase experimental, se determinó que el método de tinción más eficiente y rápido es empleando el colorante Giemsa madre a 5 (s) de exposición. Además, con los resultados obtenidos en este estudio, se elaboró este nuevo protocolo de frotis sanguíneo para el estudio hematológico de tortugas dulceacuícolas:

Ubicar la vena coccígea. Lavar la zona de punción con agua de grifo, hasta eliminar la posible suciedad. Limpiar la zona de punción con torundas y alcohol al 70%. Dejar reposar un minuto. Preparar la jeringa esterilizada de acuerdo a las medidas de los ejemplares (0.5 ml para organismos con peso de 0.400-0.900 kg, 1 ml para especímenes con peso de 0.901-2.000 kg y 3 ml para organismos con peso de 2.001-6.000 kg). Insertar de uno a dos cuartos de la aguja de jeringa en un ángulo de 45°. Extraer la cantidad de sangre requerida, según las réplicas en el estudio y el tamaño de los ejemplares de tortugas. Retirar la jeringa y colocar una torunda por un minuto en el sitio de punción para prevenir infecciones. Preparar portaobjetos debidamente limpios para depositar las muestras sanguíneas y portaobjetos guías para la extensión de la sangre. Depositar aproximadamente 40 µl de sangre en el portaobjeto. (Esto disminuye el número de células traslapadas y una mejor extensión de las células). Realizar el frotis a toda longitud del portaobjeto. Etiquetar debidamente el frotis sanguíneo. Dejar secar las muestras a temperatura ambiente por 60 min, en una zona aislada y libre de polvo. Preparar alcohol desnaturalizado con benzoato de denatonio (0.7 mg/100 ml) en frío a 4 °C. Sumergir las muestras de frotis sanguíneo en alcohol desnaturalizado en un rango de 0.5 a 5 min. Este rango, es el ideal para fijar los frotis sin que las células (eritrocitos) reciban algún daño en la membrana celular. Transcurrido el tiempo de fijado, retirar el portaobjeto sumergido y escurrir el excedente de alcohol desnaturalizado en posición vertical. Secar las muestras a temperatura de 26±1.0 °C durante 60 min (tiempo

mínimo) o envejecer las muestras de 12 h (tiempo mínimo) a 24 h (tiempo máximo) en una zona aislada y libre de polvo (Es una recomendación basada en experiencias previas de este autor). Añadir colorante Giemsa madre de forma homogénea en el portaobjetos. Teñir las muestras fijadas con Giemsa madre en un rango de 5 a 10 s. Retirar el colorante y escurrir el excedente. Enjuagar el portaobjeto con la muestra teñida con agua destilada. Evitar usar agua de grifo para prevenir posible contaminación. Escurrir la muestra, colocando el portaobjeto de forma vertical por 5 min. Dejar secar las muestras a temperatura de 26 ± 1.0 °C durante 60 min. Observar en el microscopio óptico. La calidad de las microfotografías de las muestras sanguíneas fijadas y teñidas con este nuevo protocolo deben ser igual o similar a la Figura 9, aplicado a *T. v. venusta*, *S. triporcatus* y *R. areolata*.

2.5. REFERENCIAS

- Acharya, G., & Mohanty, P.K. (2019). Comparative cytomorphometry of red blood cells of some fishes. *African Journal of Biological Sciences*, 1(1), 23-32. <https://doi.org/10.33472/AFJBS.1.1.2019.23-32>
- Allender, M.C., & Mitchell, M.A. (2013). Hematologic response to experimental infections of frog Virus 3-Like virus in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 23(1-2), 25-31. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-23.1.25>
- Anderson, E.T., Harms, C.A., Stringer, E.M., & Cluse, W.M. (2011). Evaluation of hematology and serum biochemistry of cold-stunned gree sea turtles (*Chelonia mydas*) in North Carolina, USA. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42(2), 247-255. <https://doi.org/10.1638/2010-0217.1>
- Arias-Rodriguez, L., Indy, J.R., Páramo-Delgadillo, S., & Álvarez-González, C.A. (2019). Avances en el conocimiento genético de la biodiversidad. En A. Cruz-Angón; J. Cruz-Medina; J. Valero-Padilla; F.P. Rodríguez-Reynaga; E.D. Melgarejo; E.E. Mata-Zayas, & D.J. Palma-López (Coords.). *La biodiversidad en Tabasco. Estudio de estado*. (Vol. 2, pp. 399-404). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

- Arikan, H., & Çiçek, K. (2010). Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish herpetofauna. *Acta Herpetologica*, 5(2), 179-198. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-9032
- Arikan, H., & Çiçek, K. (2014). Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western Journal of Zoology*, 10(1), 190-209.
- Campbell, T.W. (2015). Exotic animal hematology and cytology. (4th Edition). Iowa: Wiley Blackwell.
- Carrascal-Velásquez J, Negrete-Cartajena H, Rojano-Bolaño C, Álvarez-Otero G, Chacón-Pacheco J, Linares-Arias J. 2014. Caracterización hematológica de hixoteas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 28, 43-55. <https://doi.org/10.19052/mv.3180>
- Collin, A., Hardonnière, K., Chevanne, M., Vuillemin, J., Podechard, N., Burel, A., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossman, D., & Sargent, O. (2014). Cooperative interaction of benzo [a] pyrene and ethanol on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.029>
- Corrales-Ramírez, L.C., & Caycedo-Lozano, L. (2020). Principios fisicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *NOVA*. 18(33), 73-100. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Dessauer, H.C. (1970). Blood chemistry of Reptiles: Physiological and evolutionary aspects. In K. Gans, & T.S Parsons (Eds.). *Biology of the Reptilia*. (Vol. 3, Chap. 1, pp. 1-72). Academic Press Inc.
- Ernst, C.H., & Barbour, R.W. (1989). *Turtles of the world* (1st Edition). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Flores-Villela, O., García-Vázquez, U.O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 467-475. <https://doi.org/10.7550/rmb.43236>
- Flower, J.E., Norton, T.M., Andrews, K.M., Parker, C.E., Romero, L.M., Rockwell, K.E., & Mitchell, M.A. (2018). Baseline corticosterone, hematology, and biochemistry results and correlations to reproductive success in nesting loggerhead sea turtle (*Caretta*

- caretta). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49(1), 9-17.
<https://doi.org/10.1638/2017-0051R1.1>
- García-Grajales, J., Arcos-García, J.L., Ramírez-Fuentes, E., & Meraz, J. (2017). La investigación científica sobre tortugas marinas en México: Una revisión a las actividades y acciones de investigación y conservación. *Ciencia y Mar*, 21(63), 3-12.
- Gurtovenko, A.A., & Anwar, J. (2009). Interaction of ethanol with biological membranes: The formation on nonbilayer structures within the membrane interior and their significance. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(7), 1983-1992.
<https://doi.org/10.1021/jp808041z>
- Hadžimusić, N., Rukavina, D., Škapur, V., & Velić, L. (2020). Effects of storage duration on haematological parameters of the red eared slider *Trachemys scripta elegans*. *Veterinarska Stanica*, 51(6), 639-644. <https://doi.org/10.46419/vs.51.6.3>
- Hernández, J.D., Castro, P., Saavedra, P., Ramírez, P., & Oros, J. (2017). Seasonal variations in haematological parameters in yellow-bellied slider turtle (*Trachemys scripta scripta*). *Veterinári Medicina*, 62(7), 394-400. <https://doi.org/10.17221/159/2016-VETMED>
- IUCN. 2021. *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3*. [Sitio Web]. <https://www.iucnredlist.org>.
- Kaye, M.D., Schmalzl, K., Nibali, V.C., Tarek, M., & Rheinstädter, M.C. (2011). Ethanol enhances collective dynamics of lipid membranes. *Physical Review E*, 83, 050907. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.83.050907>
- Lee, S.Y., Park, H.J., Best-Popescu, C., Jang, S., & Park, Y.K. (2015). The effects of ethanol on the morphological and biochemical properties of individual human red blood cells. *PLOS ONE*, 10(12), e0145327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145327>
- Legler, J., & Vogt, R.C. (2013). *The turtles of Mexico: Land and freshwater forms*. (1st Edition). Berkeley: University of California Press.
- Macíp-Ríos, R., Ontiveros, R., López-Alcaide, S., & Casas-Andreu, G. (2015). The conservation status of the freshwater and terrestrial turtles of Mexico: a critical review of biodiversity conservation strategies. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 1048-1057. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.09.013>

- Machado, C.R.D., Glugoski, L., Domit, C., Pucci, M.B., Goldberg, D.W., Marinho, L.A., da Costa, G.W.W.F., Nogaroto, V., & Vicari, M.R. (2020). Comparative cytogenetics of four sea turtle species (Cheloniidae): G-banding pattern and in situ localization of repetitive DNA units. *Cytogenetic and Genome Research*. 160, 531-538. <https://doi.org/10.1159/000511118>
- Martínez-Silvestre, A., & Cuenca, S.L.R. (2011). Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 31(3), 131-141.
- Mesquita, R., Gonçalves, M.I., Dias, S., Sargento, L., Sladanha, C., & e Silva, J.M. (1999). Ethanol and erythrocyte membrane interaction: a hemorheologic perspective. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 21(2), 95-98.
- Nguyen, S.T., Nguyen, H.T.L., Truong, K.D. (2020). Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomedical Research and Therapy*, 7(7), 3855-3859. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i7.614>
- Osman, A.G.M., AbouelFadl, K.Y., El Reheem, A.E.B.M.A., Mahmoud, U.M., Kloas, W., & Moustafa, M.A. (2018). Blood biomarkers in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and African catfish *Clarias gariepinus* to evaluate water quality of the River Nile. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 12(1), 1-10. <http://dx.doi.org/10.21767/1307-234x.1000141>
- Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B.W., Holopainen, J., & Karttunen, M. (2006). Under the influence of alcohol: The effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 90(4), 1121-1135. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.062364>
- Perpiñán, D., & Sánchez, C. (2009). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the European pond turtle (*Emys orbicularis*) and the Mediterranean pond turtle (*Mauremys leprosa*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 19(4), 119-127. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-19.4.119>
- Radisic, R., Owens, S.D., Manire, C.A., Montgomery, N., Mader, D., Zirkelbach, B., & Stacy, N.I. (2020). Red blood cell osmotic fragility in healthy loggerhead and green sea turtles. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 908-911. <https://doi.org/10.1177%2F1040638720957117>

- Ramakrishnan, A., Palanivelrajan, M., Thangapadiyan, M., Sumathi, D., & Senthilkumar, K. (2018). Haematology analysis of rescued olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4), 1128-1131.
- Ramírez-Acevedo, L.M., Martínez-Blas, S.S., & Fuentes-Mascorro, G. (2012). Hemograma y características morfológicas de las células sanguíneas de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de Oaxaca, México. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 22(5), 468-476.
- Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., Bour, R., Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H.B., & van Dijk, P.P. (2021). Turtles of the world. Annotated checklist and Atlas of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. *Chelonian Research Monographs*, 8, 1-472. <http://dx.doi.org/10.3854/crm.8.checklist.atlas.v9.2021>
- Rivera, J.L., & Lima, E. (2013). Efecto desorbedor del metanol en la membrana celular. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 93-97. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72080-1](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72080-1)
- SEMARNAT. (2019) Modificación del anexo normativo III, lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación.
- SEMARNAT. (2001a) Norma Oficial Mexicana NOM-126-ECOL-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación.
- SEMARNAT. (2001b) Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación.
- SEMARNAT. (2010). *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.* México.

- Sinaei, M., Bolouki, M., Ghorbanzadeh, S.G., & Talebi Matin, M. (2019). Evaluation of hematological and plasma biochemical parameters in green sea turtle (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758) from nesting colonies of the northern coast the Sea of Oman. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(4), 891-902. <https://doi.org/0.22092/ijfs.2019.118320>
- Smith, H.M., & Smith, R.B. (1979). Synopsis of the Herpetofauna of Mexico: Guide to Mexican turtles: Bibliographic addendum III, Volume VI (1st Edition). Coopersburg: John Johnson.
- Snyder, G.K., & Sheafor, B.A. (1999). Red blood cells: Centerpiece in the evolution of the vertebrate circulatory system. *American Zoologist*, 39(2), 189-198. <https://doi.org/10.1093/icb/39.2.189>
- Sonmez, M., Ince, H.Y., Yalcin, O., Ajdžanović, V., Spasojević, I., Meiselman, H.J., & Baskurt, O.K. (2013). The effects of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size. *PLOS ONE*, 8(9), e76579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076579>
- Stacy, N.I., Alleman, A.R. & Sayler, K.A. (2011). Diagnostic hematology of Reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 87-108. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.006>
- Tyrrell, L., Rose, G., Shukri, A., & Kahwash, S.B. (2021). Morphologic changes in red blood cells: An illustrated review of clinically important light microscopic findings. *Malaysian Journal of Pathology*, 43(2), 219-239.
- Wittenberg, N.J., Zheng, L., Winograd, N., & Ewing, A.G. (2008). Short-chain alcohols promote accelerated membrane distention in a dynamic liposome model of exocytosis. *Langmuir*, 24(6), 2637-2642. <https://doi.org/10.1021/la703171u>
- Zhang, F., Gu, H., & Li, P. (2011). A review of Chelonian hematology. *Asian Herpetological Research*, 2(1), 12-20. <http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1245.2011.00012>
- Zar, J. (1984). Biostatistical Analysis (6th Edition) New York: Prentice Hall.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ADN Y EL TAMAÑO DEL GENOMA EN NUEVE ESPECIES DE TORTUGAS DULCEACUÍCOLAS TROPICALES

Javier Hernández-Guzmán¹, Viridiana Peraza-Gómez² & Lenin Arias-Rodríguez¹

Resumen: En este estudio se aborda nuevo conocimiento sobre la genética de las tortugas dulceacuícolas tropicales, principalmente en Tabasco, sureste de México. Existen diversos reportes de la composición del genoma en tortugas en el mundo, pero las nueve especies de tortugas que habitan en Tabasco no tienen información genética de este tipo. El objetivo de esta investigación fue identificar el contenido de ADN y calcular el tamaño del genoma inédito en nueve especies de tortugas dulceacuícolas y aportar nuevo conocimiento a la genética de estas especies. El contenido de ADN 2C en picogramos (pg) y el tamaño del genoma TG en pares de bases (pb) y Mega pares de bases (Mpb) en las tortugas fue: *Kinosternon leucostomum leucostomum* 2C= 5.30 pg y TG= 5.18 pb (5183.40 Mpb), *K. acutum* 2C= 6.82 pg y TG= 6.67 pb (6669.96 Mpb), *K. scorpioides cruentatum* 2C= 7.30 pg y TG= 7.13 pb (7139.40 Mpb), *Saturotypus triporcatus* 2C= 7.43 pg y TG= 7.26 pb (7266.54 Mpb), *Claudius angustatus* 2C= 7.58 pg y TG= 7.41 pb (7413.24 Mpb), *Rhinoclemmys areolata* 2C= 5.85 pg y TG= 5.72 pb (5721.30 Mpb), *Trachemys venusta venusta* 2C= 5.36 pg y TG= 5.24 pb (5242.08 Mpb), *Dermatemys mawii* 2C= 6.56 pg y TG= 6.41 pb (6415.68 Mpb) y *Chelydra rossignonii* 2C= 4.99 pg y TG= 4.88 pb (4880.22 Mpb). Adicionalmente, se identificaron tortugas con poliploidía celular. En este trabajo proponemos dos hipótesis principales que podrían dar respuesta a estos resultados, como es el caso de la hibridación natural o la exposición a contaminantes genotóxicos; por lo que tenemos una mejor comprensión sobre el contenido de ADN en las tortugas dulceacuícolas que habitan en el sureste mexicano.

Palabras clave: Aneuploidía, genoma, poliploidía, tortugas dulceacuícolas.

¹División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa- Cárdenas Km. 0.5 S/N, Entronque a Bosques de Saloya. CP. 86150, Villahermosa, Tabasco, México.

²Unidad Académica Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Universidad Autónoma de Nayarit, Bahía Matanchén Km. 12, Carretera a los Cocos, CP. 63740, San Blas, Nayarit, México.

Enviado a: Revista Bio Ciencias

Nombre de la Editorial: Universidad Autónoma de Nayarit

Fecha de envío: 25 de noviembre de 2025

3.0. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ADN Y EL TAMAÑO DEL GENOMA EN NUEVE ESPECIES DE TORTUGAS DULCEACUÍCOLAS TROPICALES

Abstract: This study presents new knowledge about the genetics of tropical freshwater turtles, primarily in Tabasco, southeastern Mexico. While there are numerous reports on the genome composition of turtles worldwide, the nine turtle species inhabiting Tabasco lack such genetic information. The aim of this research was to identify the DNA content and estimate the size of the previously unpublished genome in nine freshwater turtle species, contributing new knowledge to the genetics of these species. The 2C DNA content in picograms (pg) and the GS genome size in base pairs (bp) and megabase pairs (Mbp) in the turtles was: *Kinosternon leucostomum leucostomum* 2C= 5.30 pg and GS= 5.18 bp (5183.40 Mbp), *K. acutum* 2C= 6.82 pg and GS= 6.67 bp (6669.96 Mbp), *K. scorpioides cruentatum* 2C= 7.30 pg and GS= 7.13 bp (7139.40 Mbp), *Saturotypus triporcatus* 2C= 7.43 pg and GS= 7.26 bp (7266.54 Mbp), *Claudius angustatus* 2C= 7.58 pg and GS= 7.41 bp (7413.24 Mbp), *Rhinoclemmys areolata* 2C= 5.85 pg and GS= 5.72 bp (5721.30 Mbp), *Trachemys venusta venusta* 2C= 5.36 pg and GS= 5.24 bp (5242.08 Mbp), *Dermatemys mawii* 2C= 6.56 pg and GS= 6.41 bp (6415.68 Mbp) and *Chelydra rossignoni* 2C= 4.99 pg and GS= 4.88 bp (4880.22 Mbp). Additionally, turtles with cellular polyploidy were identified. In this work we propose two main hypotheses that could explain these results, such as natural hybridization or exposure to genotoxic contaminants; Therefore, we have a better understanding of the DNA content in freshwater turtles that inhabit southeastern Mexico.

Key words: Aneuploidy, genome, poliploidy, freshwater turtles, Tabasco.

3.1 INTRODUCCIÓN

En el estado de Tabasco, sureste de México, habitan en total nueve especies de tortugas dulceacuícolas que se distribuyen en cinco familias: pochitoque común *Kinosternon leucostomum leucostomum leucostomum*, pochitoque escorpión *K. scorpioides cruentatum*, pochitoque jahuactero *K. acutum*, tortuga tres lomos *S. triporcatus* y la tortuga taimán *Claudius angustatus* en la familia Kinosternidae; la tortuga chiquiguo *Chelydra rossignonii* de la familia Chelydridae; la tortuga blanca *Dermatemys mawii* de la familia Dermatemydidae; la tortuga hicotea *T. v. venusta* de la familia Emydidae y la tortuga mojina *R. areolata* de la familia Geoemydidae (Barragán-Vázquez et al., 2022).

A pesar de que estas especies se encuentran con estatus de conservación por la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 con la excepción de *C. rossignonii* y *T. v. venusta* (Barragán-Vázquez et al. 2022), en Tabasco existen muy pocos estudios de genética en las tortugas dulceacuícolas (Zenteno-Ruiz et al., 2019), como los estudios cromosómicos y cariotípicos en las tortugas *K. l. leucostomum*, *S. triporcatus* y *T. v. venusta* de Hernández-Guzmán et al. (2014, 2015, 2019) y los estudios de variación genética poblacional en *D. mawii* de Gallardo et al. (2019) y en *T. v. venusta* de Recino-Reyes et al. (2020).

Otro estudio que aportaría información relevante a la genética de estas tortugas es el contenido de ADN o valor C para calcular el tamaño del genoma, el cual se define como el contenido de ADN de un genoma holoploide con número cromosómico n , es decir, de acuerdo con la información cuantitativa el número del prefijo que indica el nivel de ADN puede variar de 1C, 2C, 4C, entre otros (Greilhuber et al., 2005), así como la naturaleza del organismo o de su dinámica celular y genética como en los individuos híbridos y los poliploides espontáneos (Greilhuber & Doležel 2009).

En las tortugas dulceacuícolas existen numerosos reportes del contenido de ADN o valor C, los cuales han sido analizados y calculados con diversos métodos y herramientas como citometría de Feulgen, citometría de flujo, fluorometría de célula estática, densitometría por análisis de imagen Feulgen y flujo cariotípico entre otras variantes, así como la base de datos “Animal Genome Size Database (AGSD)” que recopila los avances del contenido de ADN en las especies, complementado con información inédita (Doležel et al., 1998; Kasai et al., 2012; Gregory, 2023). Sin embargo, las nueve especies de tortugas dulceacuícolas nativas

que habitan y se distribuyen en el estado de Tabasco, en el sureste de México, no tienen registros del contenido de ADN o valor C, incluyendo la base de datos AGSD (Gregory, 2023).

En este estudio, aplicamos el método de citometría de Feulgen por su utilidad y practicidad, es decir, por la ventaja de visualizar núcleos interfásicos G1 individuales, control de imagenología, por la calidad en el almacenamiento de muestras a largo plazo y la nula presencia de picos residuales en el histograma (Doležel et al., 1998; Greilhuber, 2008), con el objetivo de determinar el contenido de ADN 2C en picogramos “pg”, calcular el tamaño del genoma en pares de bases “pb” y Mega pares de bases “Mpb”, y otros caracteres genéticos adicionales en todas las especies de tortugas dulceacuícolas de Tabasco, en México.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Área de estudio y recolecta

Se recolectaron 127 individuos de tortugas dulceacuícolas tropicales por observación visual en ambiente silvestre, distribuidas en nueve especies: la tortuga mojina *Rhinoclemmys areolata* (29: 19 hembras y 10 machos), la hicotea *T. v. venusta* (22: 12 hembras y 10 machos), el tres lomos *S. triporcatus* (12: ocho hembras y cuatro machos), el pochitoque común *K. l. leucostomum* (15: siete hembras y ocho machos), el pochitoque jahuactero *K. acutum* (10: seis hembras y cuatro machos), el pochitoque escorpión *K. scorpoides cruentatum* (10: siete hembras y tres machos), el taimán *C. angustatus* (10: cuatro hembras y seis machos), el chiquiguo *C. rossignoni* (nueve: tres hembras y seis macho) y la tortuga blanca *D. mawii* (10: cinco hembras y cinco machos). Las tortugas fueron observadas y recolectadas manualmente de las lagunas del Pueblo y Huapacal de la Villa Luis Gil Pérez, así como el área conservada de tinal de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco “UJAT” en el municipio del Centro, de los márgenes de los pantanos de la Villa Sánchez Magallanes, municipio de Cárdenas, de los humedales del poblado Federico Álvarez, municipio de Jonuta y de las lagunas tres lomos en los pantanos del municipio de Centla, todas las localidades del estado de Tabasco, México. Los individuos recolectados, se mantienen vivos y en condiciones óptimas de mantenimiento, calidad de agua y alimentación en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la UJAT. La identificación taxonómica, se basó en la nomenclatura de Legler y Vogt

(2013), Ernst y Barbour (1989), Smith y Smith (1979) y atendiendo la última actualización en taxonomía, sinonimia, distribución, estatus de conservación y lista anotada de las especies de tortugas dulceacuícolas en el mundo (Rhodin et al., 2021). Todas las especies fueron tratadas de acuerdo a los estándares bioéticos nacionales, cumpliendo con las normas oficiales mexicanas NOM-126-SEMARNAT-2000 y NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2019). Este documento se realizó con el permiso federal de colecta de SEMARNAT SGPA/DGVS/04315/11, y con la aprobación de la Comisión Institucional de Ética en Investigación “CIEI” con número de Folio: 0985, por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en México.

3.2.2. Muestra sanguínea, fijado y tinción

La muestra de sangre se extrajo de la vena coccígea, desinfectando la región seleccionada con algodón humedecido de alcohol etílico al 70%; de acuerdo al peso de cada espécimen se utilizaron jeringas estériles: 0.5 ml para organismos de 300-900 g, jeringas de 1 ml para especímenes de 2 kg y de 3 ml para organismos con peso de 2 a 6 kg, extrayendo máximo 300 microlitros (0.3 ml) de sangre por cada tortuga. Inmediatamente, se colocó una gota (40 μ l aproximadamente) de sangre individualmente en tres portaobjetos (por cada espécimen) limpios y estériles, efectuando el deslizamiento por capilaridad, extendiendo suave y homogéneamente. Los frotis sanguíneos se dejaron secar a temperatura ambiente (29.0 ± 0.5 °C) por 60 min. Después, los frotis sanguíneos fueron fijados con etanol desnaturalizado con benzoato de denatonio (0.7 mg/100 ml) a 4 °C por 1 min. Después, las muestras fijadas se dejaron secar a 29 ± 1.0 °C y envejecer durante 12 h. Por último, todas las muestras fueron teñidas con colorante Giemsa madre, dejando a exposición durante 10 s, posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua bidestilada para eliminar el exceso de colorante y dejando secar a 27 ± 1.0 °C.

3.2.3. Elaboración de muestras por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras fueron lavadas con buffer de fosfatos (PBS) con el fin de eliminar los restos del fijador (descrito en el apartado anterior), para ello las muestras fueron centrifugadas a 1000 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente fueron colocadas en etanol al 100% antes de ser sometidas al punto crítico de secado con el equipo CPD-030 Dryer (Bal-

Tec AG Balzers, Liechtenstein). Después, las muestras fueron recubiertas con oro-paladio, mediante dispersión con la recubridora SCD-050 Sputter Coater (Bal-Tec AG Balzers, Liechtenstein). Las preparaciones de eritrocitos se escanearon y digitalizaron con el Microscopio Electrónico de Barrido 6380- LV (JEOL Ltd. Japan) a 25 V del Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Charles en Praga, República Checa (Unión Europea). Los mejores campos de eritrocitos fueron seleccionados y analizadas para su biometría nuclear (Arias-Rodriguez, 2007; López-Hernández, 2017).

3.2.4. Microscopía óptica y biometría nuclear

Se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss®, equipado con cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss), utilizando el objetivo de 10x para la búsqueda de dispersiones celulares (eritrocitos) y el objetivo de 40x + 1.25x optovar para la toma de microfotografías. Las mejores imágenes fueron seleccionadas y tratadas para su optimización en el software ZEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011). La medición del área nuclear en μm^2 , fue elaborado con el software ImageJ 1.53t (National Institutes of Health, USA). Las matrices de mediciones nucleares se llevaron a cabo con Microsoft® Office Excel LTSC Profesional Plus 2021.

3.2.5. Tamaño del genoma por análisis nuclear en microscopía y citometría

Para calcular el tamaño del genoma de las nueve especies de tortugas dulceacuícolas tropicales de Tabasco, primero se determinó el peso en picogramos (pg) del núcleo interfásico G1 por citometría de imágenes de Feulgen (Olmo, 1976), empleando la siguiente fórmula modificada para reptiles, partiendo del modelo original de Doležal y Bartoš (2005): $2C \text{ ADN} = [(\text{Media del área nuclear G1 de la muestra de especie en estudio}) / (\text{Media del área nuclear G1 de la muestra estándar})] \times \text{Contenido } 2C \text{ ADN de la muestra estándar en pg.}$

Donde: La media del área nuclear G1 de la muestra de especie en estudio, corresponde a la especie de tortuga. La media del área nuclear G1 de la muestra estándar utilizada, correspondió a células sanguíneas de clones de *Oncorhynchus mykiss* con registro previamente calculado de $17.97 \pm 1.32 \mu\text{m}^2$ (Tabla 4). El contenido de ADN de la muestra estándar fue el de *O. mykiss* con $2C = 5.5 \pm 0.05 \text{ pg}$ (Tiersch et al., 1989; Doležal et al., 2003).

Posteriormente, se calculó el tamaño del genoma o valor “C” en pares de bases “pb”, empleando la fórmula estandarizada de Doležel et al. (2003) (Doležel & Bartoš 2005; Doležel & Greilhuber 2010):

$$TG_{pb} = 1_{pg} \text{ ADN} \times 2C_{pg}$$

Dónde: TG_{pb} = Tamaño del genoma en pares de base, $1_{pg} \text{ ADN} = 0.978 \times 10^9 \text{ pb}$, $2C_{pg}$ = Contenido de ADN nuclear diploide (eritrocito) en pg de la especie de tortuga.

Además, se hizo la conversión del tamaño del genoma a mega pares de bases “Mpb” a partir de la fórmula Doležel et al. (2003), donde $1_{pg} \text{ de ADN} = 978 \text{ Mpb}$ (Dai et al., 2022).

Tabla 4. Citometría de núcleos interfásicos en G1 y tamaño del genoma de la muestra estándar en clones de *O. mykiss*.

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NG1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Tamaño del núcleo (μm^2)	19.32	17.96	18.84	18.19	18.33	17.42	17.17	17.13	17.34	18.05
D.E.	1.13	0.94	1.20	1.28	1.30	1.21	1.01	1.04	1.12	1.01

Media del área nuclear G1: $17.97 \mu\text{m}^2$

D.E. = 1.32

TG_{pg} = $5.5 \pm 0.05 \text{ pg}^*$

N= Número de individuos clones de *O. mykiss*, NG1= Núcleos interfásicos en G1, D.E.= Desviación estándar, TG_{pg} = Tamaño del genoma en picogramos “pg”. *= Valor calculado por Tiersch et al. (1989) y Doležel et al. (2003).

3.2.6. Análisis estadístico

Una vez calculado el contenido de ADN o valor 2C y el tamaño del genoma fueron analizados en acuerdo al cumplimiento de las pruebas de homogeneidad y homocedasticidad con análisis de Kruskal-Wallis (K-W); y en el caso de observarse diferencias significativas (cuando $P \leq 0.05$), se aplicó la prueba de Dunn’s a $P \leq 0.05$ (Zar, 1984), aplicando el software estadístico SigmaPlot® (12.3 de Systat Software Inc®).

3.3. RESULTADOS

Se analizaron en total 19935 núcleos interfásicos en G1. Las nueve especies de tortugas dulceacuícolas presentaron el valor 2C diferente. En la familia Kinosternidae, los núcleos interfásicos G1 variaron de $17.19 \pm 1.19 \mu\text{m}^2$ y con contenido de ADN $2C = 5.30 \text{ pg}$ ($5.183 \times 10^9 \text{ pb}$ ó 5183.40 Mpb) en *K. l. leucostomum* y núcleos interfásicos G1 de 24.59 ± 1.60 y contenido de ADN $2C = 7.58 \text{ pg}$ ($7.413 \times 10^9 \text{ pb}$ ó 7413.24 Mpb) en la especie *C. angustatus* (Tabla 5). Las otras tres especies *K. acutum*, *K. s. cruentatum* y *S. triporcatus* estuvieron en el rango mencionado previamente con 6.82, 7.30 y 7.43 pg respectivamente (Figura 10A, B, C, D, E). En el resto de las especies, se destaca a la tortuga *C. rossignonii* de la familia Chelydridae con el núcleo interfásico G1 más pequeño con $16.19 \pm 1.45 \mu\text{m}^2$ y contenido de ADN $2C = 4.99 \text{ pg}$ ($4.880 \times 10^9 \text{ pb}$ ó 4880.22 Mpb) (Tabla 5). Las otras especies de tortugas dulceacuícolas *T. v. venusta*, *R. areolata* y *D. mawii* tuvieron contenido de ADN de 5.36, 5.85 y 6.56 pg respectivamente (Figura 11A, B, C, D).

Tabla 5. Contenido de ADN o valor-2C en las tortugas dulceacuícolas de Tabasco.

Especie	N	Núcleos interfásicos G1	Promedio nuclear (μm^2) $\pm$ D.E	Valor 2C (pg)	TG $\times 10^9$ (pb)	TG (Mpb)
Familia Kinosternidae						
<i>K. leucostomum</i>	12	1382	17.19 ± 1.19	5.30a	5.183a	5183.40a
<i>K. acutum</i>	10	1967	22.11 ± 2.15	6.82a	6.670a	6669.96a
<i>K. s. cruentatum</i>	8	1681	23.69 ± 2.24	7.30a	7.139a	7139.40a
<i>S. triporcatus</i>	11	1344	24.10 ± 1.69	7.43a	7.267a	7266.54a
<i>C. angustatus</i>	10	1516	24.59 ± 1.60	7.58a	7.413a	7413.24a
Familia Geoemydidae						
<i>R. areolata</i>	21	2436	18.98 ± 1.31	5.85a	5.721a	5721.30 ^a
Familia Emydidae						
<i>T. v. venusta</i>	22	4056	17.52 ± 1.26	5.36a	5.242a	5242.08a
Familia Dermatemydidae						
<i>D. mawii</i>	9	1606	21.26 ± 1.71	6.56a	6.416a	6415.68a
Familia Chelydridae						
<i>C. rossignonii</i>	9	1409	16.19 ± 1.45	4.99a	4.880a	4880.22a
Totales	112	17397				

N= número de individuos, D.E.= Desviación estándar, TG= Tamaño del genoma, pg= Picogramos, pb= Pares de bases, Mpb= Mega pares de bases.

3.3.1. Contenido de ADN triploide, tetraploide y aneuploide

En la especie pochitoque común *K. l. leucostomum* se identificó a tres especímenes con núcleos interfásicos G1 triploides, presentando tamaños promedios de $23.33 \pm 2.9 \mu\text{m}^2$ y con contenido de ADN $3C = 7.19 \text{ pg}$ ($7.032 \times 10^9 \text{ pb}/7031.82 \text{ Mpb}$) y cuatro especímenes de la tortuga mojina *R. areolata* con núcleos interfásicos promedio de $22.07 \pm 1.75 \mu\text{m}^2$ y contenido de ADN $3C = 6.81 \text{ pg}$ ($6.660 \times 10^9 \text{ pb}/6660.18 \text{ Mpb}$) (Tabla 6). También se identificaron individuos con núcleos interfásicos excepcionales con tendencias de contenido de ADN tetraploide $4C$ en las especies *K. s. cruentatum* (un individuo), *R. areolata* (cuatro individuos) y *D. mawii* (un individuo) (Tabla 6, Figura 1D). Se descubrió la presencia de núcleos interfásicos G1 aneuploides en la especie *S. triporcatus* (un individuo), donde el promedio nuclear varió de $16.27 \pm 0.58 \mu\text{m}^2$, $19.81 \pm 1.51 \mu\text{m}^2$ y $36.15 \pm 1.04 \mu\text{m}^2$ y con contenido de ADN de 5.02 pg ($4.910 \times 10^9 \text{ pb}/4909.56 \text{ Mpb}$), 6.11 pg ($5.976 \times 10^9 \text{ pb}/5975.58 \text{ Mpb}$) y 11.14 pg ($1.089 \times 10^{10} \text{ pb}/10894.92 \text{ Mpb}$). Asimismo, en la especie *K. s. cruentatum* (un individuo), con variación nuclear de $14.43 \pm 1.08 \mu\text{m}^2$, $23.32 \pm 1.97 \mu\text{m}^2$ y $30.91 \pm 3.07 \mu\text{m}^2$ y con contenido de ADN de 4.45 pg ($4.352 \times 10^9 \text{ pb}/4352.1 \text{ Mpb}$), 7.19 pg ($7.032 \times 10^9 \text{ pb}/7031.82 \text{ Mpb}$) y 9.53 pg ($9.320 \times 10^9 \text{ pb}/9320.34 \text{ Mpb}$) (Figura 10D).

Tabla 6. Individuos con anomalías genéticas: triploidía y tetraploidía.

Especie	N	Núcleos interfásicos G1	Promedio nuclear (μm^2) $\pm$ D.E	Valor 3C (pg)	Valor 4C (pg)	TG (pb/Mpb)
Familia Kinosternidae						
<i>K. leucostomum</i>	3	335	23.33 ± 2.91	7.19		$7.032 \times 10^9 / 7031.82$
<i>K. s. cruentatum</i>	1	463	53.68 ± 2.84		16.55	$1.619 \times 10^{10} / 16185.9$
Familia Geoemydidae						
<i>R. areolata</i> ++	4	459	22.07 ± 1.75	6.81		$6.660 \times 10^9 / 6660.18$
<i>R. areolata</i> +++	4	686	28.31 ± 2.03		8.73	$8.538 \times 10^9 / 8537.94$
Familia Dermatemydidae						
<i>D. mawii</i>	1	168	46.75 ± 9.08		14.41	$1.409 \times 10^{10} / 14092.98$
Totales	13	2111				

N= número de individuos, TG= Tamaño del genoma, *= Población de *K. leucostomum* I, **= Población de *K. leucostomum* II, += Población *R. areolata* de Jonuta, ++= Población *R. areolata* de la Villa Luis Gil Pérez, +++= Población *R. areolata* de Tenosique, a= no hay diferencias significativas a $p=0.05$. Letras diferentes “b, c” tienen diferencias significativas entre poblaciones.

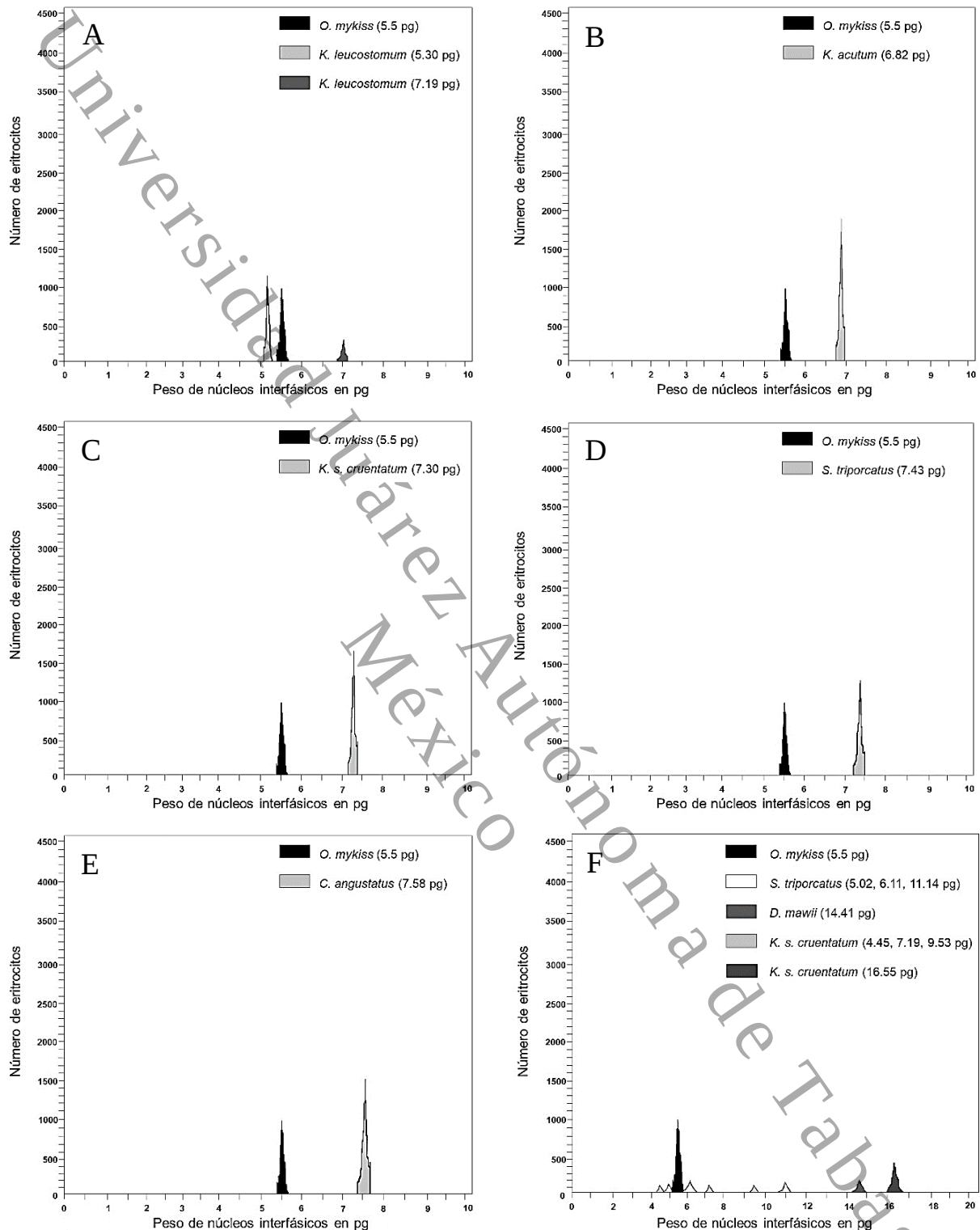


Figura 10. Histograma del contenido de ADN o valor 2C de la muestra estándar *O. mykiss* vs las tortugas de la familia Kinosternidae de Tabasco, en México: *K. l. leucostomum* (A), *K. acutum* (B), *K. s. cruentatum* (C), *S. triporcatus* (D) y *C. angustatus* (E). Anomalías genéticas (F).

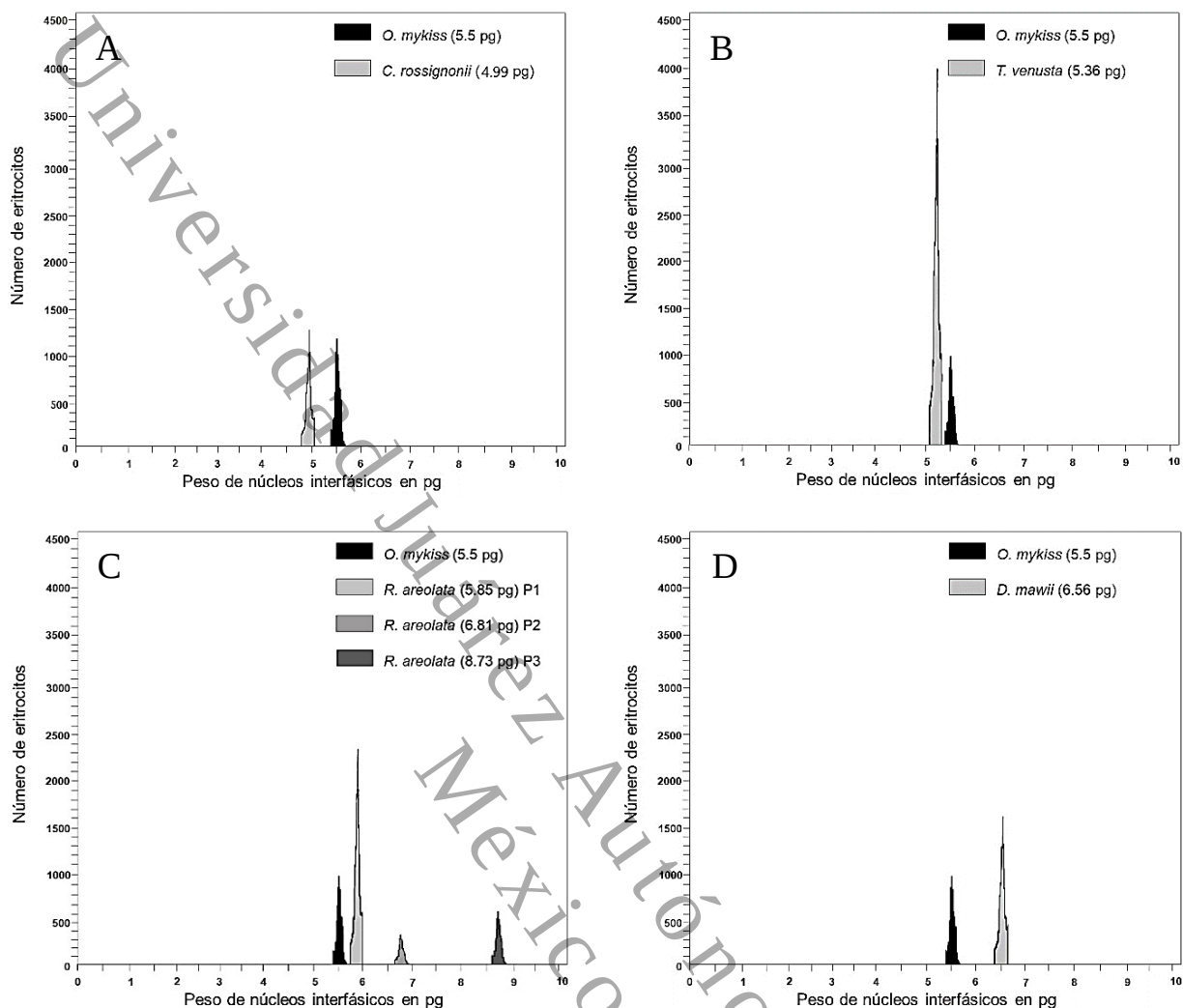


Figura 11. Histograma del contenido de ADN o valor 2C de la muestra estándar *O. mykiss* vs *C. rossignonii* (A), *T. v. venusta* (B), *R. areolata* (C) y *D. mawii* (D).

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1. Familia Kinosternidae

En este estudio se observó a un primer grupo donde el contenido de ADN o valor 2C fue menor a 6.0 pg, y donde el pochitoque común *K. l. leucostomum* de Tabasco, México, presentó el valor 2C idéntico a los reportes de Olmo (1976) y Gregory (2023) en la especie *Sternotherus odoratus* con valor 2C= 5.30 pg, además, son similares a la especie *K. subrubrum*, el cual ha presentado variación en el contenido de ADN en sus poblaciones, de

acuerdo al contenido de ADN $2C = 5.32$ pg reportado por De Smet (1981) y 5.60 pg por Olmo (1976). El segundo grupo está conformado por cuatro especies, donde el contenido de ADN es mayor a 6.0 pg. Las especies *S. triporcatus* y *C. angustatus* forman parte de este segundo grupo como era de esperarse, ya que ambos pertenecen a la subfamilia Staurotypinae y por los antecedentes genéticos y filogenéticos de Iverson et al. (2013) y Spinks et al. (2014). Sin embargo, otra especie que se relacionó a este grupo fue *K. s. cruentatum* que pertenece a la subfamilia Kinosterninae, superando los 7.0 pg (Figura 12A), esto posiblemente se deba a la existencia de variación genética en las poblaciones a nivel geográfico, ya que, estudios de genética y filogenia que involucran a *K. s. cruentatum* difieren en algunos casos, en la estrecha similitud con otras especies como puede ser observado en los trabajos de Iverson et al. (2013), Spinks et al. (2014) y López-Luna et al. (2021). Además, lo anterior es reforzado por el estudio genómico y filogeográfico en Sudamérica, donde descubrieron la presencia de tres nuevas unidades evolutivamente significativas para la subespecie *K. s. scorpioides*, una para la región del noroeste y Caribe de Colombia, así como dos al este y sureste de Colombia a partir de 1047 pb del Intron R35 y más de 35000 polimorfismos de un solo nucleótido (Caballero et al., 2022). Así como otros estudios previos que han confirmado variaciones genéticas en sus poblaciones, como es el caso de *K. flavescens* al sur de Estados Unidos de América y *K. durangoense* al norte de México por ADN mitocondrial (Serb et al., 2001).

Por otro lado, la tortuga *K. acutum* se caracteriza por mantener una distancia genéticamente razonable con respecto a otros miembros de kinosternidos (principalmente a *K. l. leucostomum* y *K. s. cruentatum*) y de la subfamilia Staurotypinae, ya que es la única especie en este estudio que presentó el contenido de ADN $2C = 6.82$ pg, es decir, mayor que 5.0 pg y menor que 7.0 pg (Figura 12A). Esto, se ha manifestado en los distintos árboles filogenéticos que se han elaborado en la familia Kinosternidae por diversas técnicas en genómica por otros autores como Iverson et al. (2013), Spinks et al. (2014) y López-Luna et al. (2021).

Las variaciones genéticas encontradas en algunos individuos de *K. l. leucostomum* como la triploidía, tetraploidía y aneuploidía en *K. s. cruentatum*, y aneuploidía en *S. triporcatus*, forman parte de una lista de estudios con reportes de anomalías celulares y genéticas en las tortugas dulceacuícolas de la familia Kinosternidae de Tabasco, México, en las especies *K. l. leucostomum* y *S. triporcatus* previamente (Hernández-Guzmán et al., 2014; 2015).

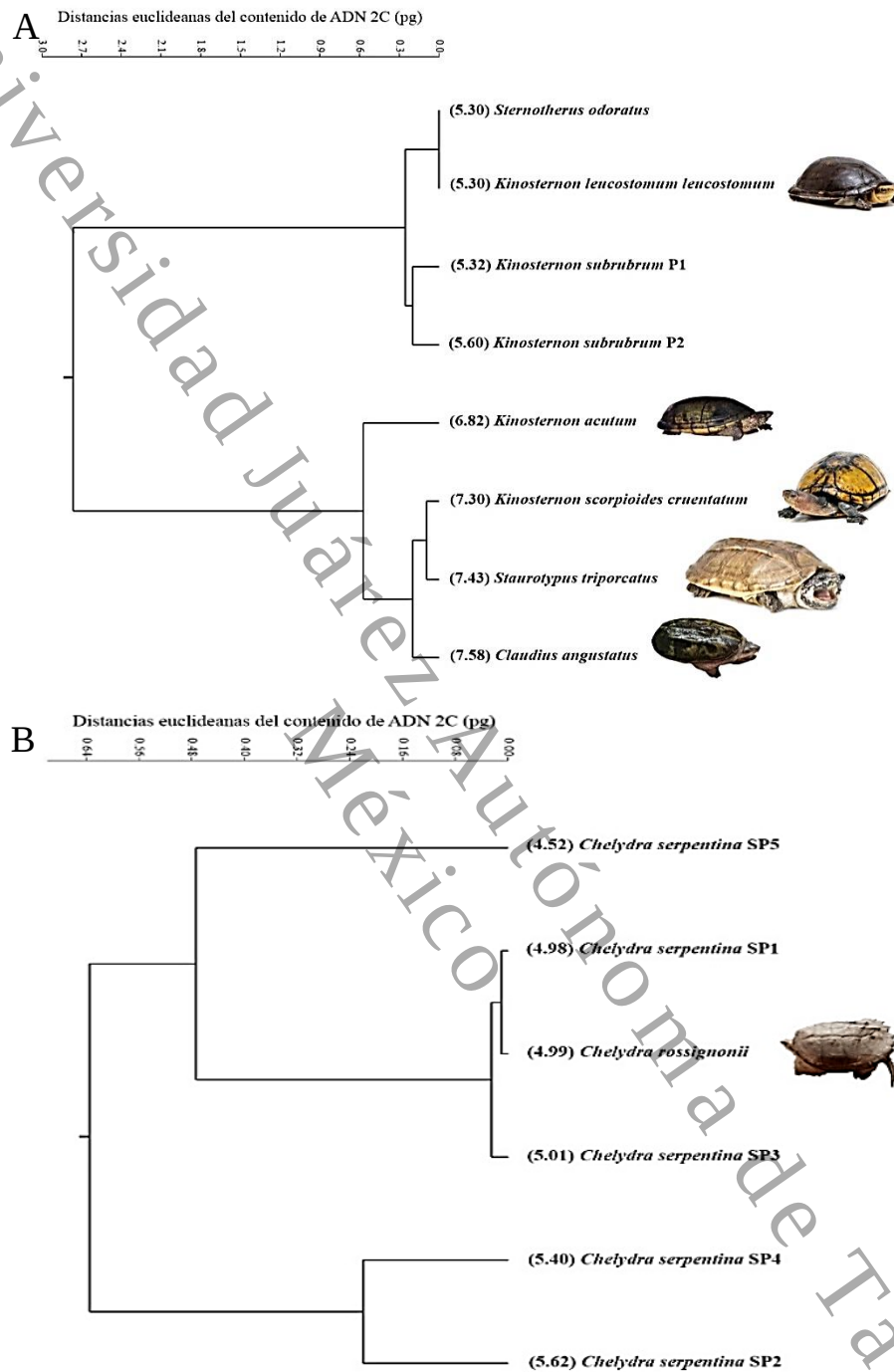


Figura 12. Dendrograma de relación con distancias euclidianas de todos los registros del contenido de ADN o valor 2C (pg) en la familia Kinosternidae (A) y Chelydridae (B). Las fotografías de las tortugas representan a las especies de este estudio.

Asumimos dos hipótesis principales que pueden explicar el origen de estas variaciones o anomalías genéticas en esta familia de tortugas dulceacuícolas:

1) La introgresión génica a través de la posible hibridación entre las especies del género *Kinosternon* que comparten hábitat, esto podría ser posible ya que, a nivel cromosómico, especies como *K. l. leucostomum* y *K. s. cruentatum* comparten el mismo número de cromosomas diploide $2n=56$ (Killebrew 1975, Hernández-Guzmán et al. 2014), aunque algunas poblaciones presenten diferenciación en la morfología cariotípica (Hernández-Guzmán et al. 2014, 2015). En la familia Kinosternidae, se ha reportado la hibridación entre las especies *K. bauri* $\times$ *K. subrubrum hippocrepis* en Estados Unidos de América (Farkas & Sasvári, 1993). Aunque en tortugas dulceacuícolas, la introgresión génica y la hibridación se ha identificado con mayor frecuencia en el género *Trachemys*, entre las especies *T. decussata decussata* $\times$ *T. terrapen* y *T. decorata* $\times$ *T. stejnegeri vicina* con distribución en las islas del Caribe, *T. grayi emolli* $\times$ *T. v. uhrigi* en Centro América (Parham et al., 2013), además de *T. gaigeae* $\times$ *T. scripta elegans* y *T. s. elegans* $\times$ *T. s. scripta* en Norte América (Parham et al., 2020). Una situación similar ocurre actualmente en otros reptiles como los cocodrilos, los cuales comparten distribución, caracteres genéticos y cromosómicos compatibles con $2n=32$ (Srikulnath et al., 2015), donde se ha confirmado la presencia de híbridos originados de *Crocodylus moreletii* y *C. acutus* en poblaciones silvestres de la Península de Yucatán en México, con distribución potencial en el Golfo de México (Pacheco-Sierra et al., 2018; Pooley et al., 2021; Soria-Ortis et al., 2022), incluyendo al estado de Tabasco, donde se encuentra un ejemplar híbrido en el Parque Museo La Venta (Sigler & Gallegos-Michel, 2017) y vivo a la elaboración del presente documento; así como la presencia de híbridos de las mismas especies en la costa del Pacífico, principalmente en Oaxaca y Guerrero (Soria-Ortis et al., 2022).

2) La presencia e interacción de contaminantes genotóxicos en los diferentes ambientes acuáticos o terrestres, los cuales, pueden causar daños en el ciclo celular (Dourado et al., 2017; Arias-Rodriguez et al., 2019; Upadhyay et al., 2022). Estudios citogenéticos previos en tortugas dulceacuícolas de Tabasco, en México, han reportado la presencia de microcromosomas “B” en células somáticas y germinales, los cuales varían de 1 a 3 en las especies *K. l. leucostomum*, *S. triporcatus* y *T. v. venusta* (Hernández-Guzmán et al., 2014),

además, de variaciones en la morfología cariotípica en algunas poblaciones de *K. l. leucostomum* expuestas a los ambientes contaminados (Hernández-Guzmán et al., 2015). Dicha relación de la presencia de cromosomas supernumerarios y los ambientes contaminados de Tabasco, también ha sido retomado en otros grupos taxonómicos, principalmente en peces nativos como *Astyanax aeneus* y *Petenia splendida* (Arias-Rodriguez et al., 2008; D'artola-Barceló et al., 2019). Además, también existe evidencias de anfibios triploides en el estado de Tabasco, México, como en la especie *Rhinella horribilis* donde aún se continúa estudiando el origen de estas anomalías genéticas en este grupo taxonómico (Hernández-Guzmán et al., 2019). Mientras que para el caso del individuo aneuploide en *S. triporcatus*, existen diversas evidencias sobre el estrés celular que son desarrollados por la aneuploidía, las cuales van desde aspectos proteotóxicos (proteoma), metabólicos (metabolómica), replicación (genómica) y mitóticos (citogenéticos), los cuales tiene efectos genotípicos y fenotípicos (Pavelka et al., 2010; Sheltzer et al., 2012; Zhu et al., 2018).

3.4.2. Familia Chelydridae

En el caso de la tortuga *C. rossignonii*, nuestros resultados representan el primer reporte para la especie, sin embargo, el contenido de ADN 2C es similar al estudio temprano de Mirsky y Ris (1951) y a lo reportado en la base de datos Animal Genome Size Database (Gregory, 2023) para la especie *C. serpentina* con $2C = 4.98$ pg, la cual, ha demostrado variación en el tamaño del genoma en distintas poblaciones con $2C = 4.52, 5.01, 5.40$ y 5.62 pg (Olmo, 1976; De Smet, 1981; Vinogradov, 1998; Das et al., 2020). Además, a pesar de que el estudio del contenido de ADN 2C resultó ser similar entre *C. rossignonii* de Tabasco y con distribución en Mesoamérica vs *C. serpentina* con distribución en Norte América (Figura 12B), existen estudios de biología molecular que señalan diferencias entre estas dos especies, las cuales van de diferenciación de aminoácidos y variación en la secuencia de nucleótidos a nivel genotípico y variaciones en caracteres morfológicos a nivel fenotípico, los cuales pueden estar correlacionados con la amplitud geográfica de estas especies (Baek et al., 2020; Das et al., 2020). Por otro lado, la nula presencia de organismos con anomalías nucleares como la triploidía y tetraploidía, puede deberse al área de recolecta, ya que los

individuos tienen origen de lagunas adyacentes al área natural protegida “ANP” de la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla “RBPC”, conservando la integridad desde el punto de vista de los núcleos interfásicos G1 en *C. rossignonii*.

3.4.3. Familia Dermatemydidae

La tortuga blanca *D. mawii* es una especie monotípica (Polisar & Horwich, 1994), y nuestro resultado del contenido de ADN por citometría es el primer reporte para la especie, por lo que no es posible una comparación directa en la familia o entre poblaciones, sin embargo, esta especie también se caracteriza por ser monofilética, compartiendo un ancestro común con otras dos familias como Chelydridae y Kinosternidae en la superfamilia Chelydroidea (Thomson et al., 2021; Rhodin et al., 2021). Por lo que, la comparación del contenido de ADN 2C= 6.56 pg de *D. mawii* con los reportes de todas las especies de las familias Kinosternidae y Chelydridae, solo tiene similitud con la tortuga *K. acutum*, la cual, se caracterizó con 2C= 6.82 pg en nuestro trabajo. Además, se confirmó la presencia de un adulto hembra tetraploide proveniente del río San Pedro y San Pablo en el municipio de Jonuta, Tabasco, México, lo cual podría estar influenciado por contaminantes en el cause, ya que existen múltiples reportes de la presencia de derivados de hidrocarburos y otros contaminantes como los metales pesados en el río principal del municipio “Río Usumacinta” (Ramos-Herrera et al., 2012; Salcedo-Garduño et al., 2022), así como en otros cuerpos acuáticos del estado de Tabasco (Musálem-Castillejos et al., 2018; Romero-Calderón et al., 2016), donde recientemente se registraron niveles atípicos de metales pesados en tejidos musculares y óseos en la especie *Trichechus manatus manatus* (Romero-Calderón et al., 2016; Núñez-Nogueira & Uribe-López, 2020).

3.4.4. Familia Emydidae

Es posiblemente una de las familias de tortugas donde existe una mayor diversidad del contenido de ADN 2C y tamaño del genoma, ya que existen reportes de 2C= 2.86 pg en *T. scripta elegans* (Kasai et al., 2012) hasta 8.36 pg en *Terrapene carolina carolina* (Olmo,

1976). Con respecto a la tortuga *T. v. venusta* de Tabasco, presentó el contenido de ADN que corresponde al 56% de los estudios de citometría de esta familia, es decir, núcleos interfásicos G1 con rango de 5.0 a 5.99 pg, como es reportado en la especie *Clemmys guttata* con $2C=5.13$ pg (Vinogradov, 1998) y *Chrysemys picta dorsalis* con 5.96 pg (Olmo, 1976). El resto de los estudios previos (Figura 13), reportan contenido de ADN $2C$ menor a 5.0 pg (22%) y mayor a 6.0 pg (22%). Además, *T. v. venusta* de Tabasco, comparte similitud del contenido de ADN con una población de *T. s. scripta*, el cual registró $2C=5.30$ pg (Tiersch et al., 1989; Gregory, 2023). En esta familia, se ha identificado variación en el contenido de ADN a nivel poblacional, principalmente en las especies *T. s. elegans* (De Smet, 1981; Kasai et al., 2012), *T. s. scripta* (Tiersch et al., 1989; Lockwood et al., 1991; Gregory, 2023) y *T. c. carolina* (Olmo, 1976; Tiersch et al., 1989; Vinogradov, 1998; Gregory, 2023) (Figura 13). Aunque en este estudio no se encontraron evidencias de anomalías del contenido de ADN, como la triploidía o tetraploidía, otros estudios en genómica empleando extracción de ADN y amplificación de microsatélites en *T. v. venusta* de Tabasco, México, han reportado la diversidad genética entre poblaciones silvestres y en cautiverio (Recino-Reyes et al., 2020). Además, como ya se ha mencionado previamente en este documento, hay evidencias contundentes que las tortugas del género *Trachemys* se hibridizan en diferentes áreas geográficas del continente americano como lo ha señalado Parham et al. (2013, 2020), por lo que es importante continuar con los estudios de genética en las especies *Trachemys* que se distribuyen en Tabasco y en México, ya que la amplia distribución de *T. v. venusta* en el sureste mexicano, limita con los rangos de distribución con otras subespecies como *T. v. cataspila* y *T. v. iversoni* en la costa del Golfo de México (McCord et al., 2010; Rhodin et al., 2021) y de acuerdo con Recino-Reyes et al. (2020), existen pruebas de la interacción genética entre diferentes poblaciones de *T. v. venusta* de Tabasco, por lo que es imprescindible no descartar la posible hibridación y la posible presencia de anomalías genéticas entre estas subespecies que habitan en el sureste de México.

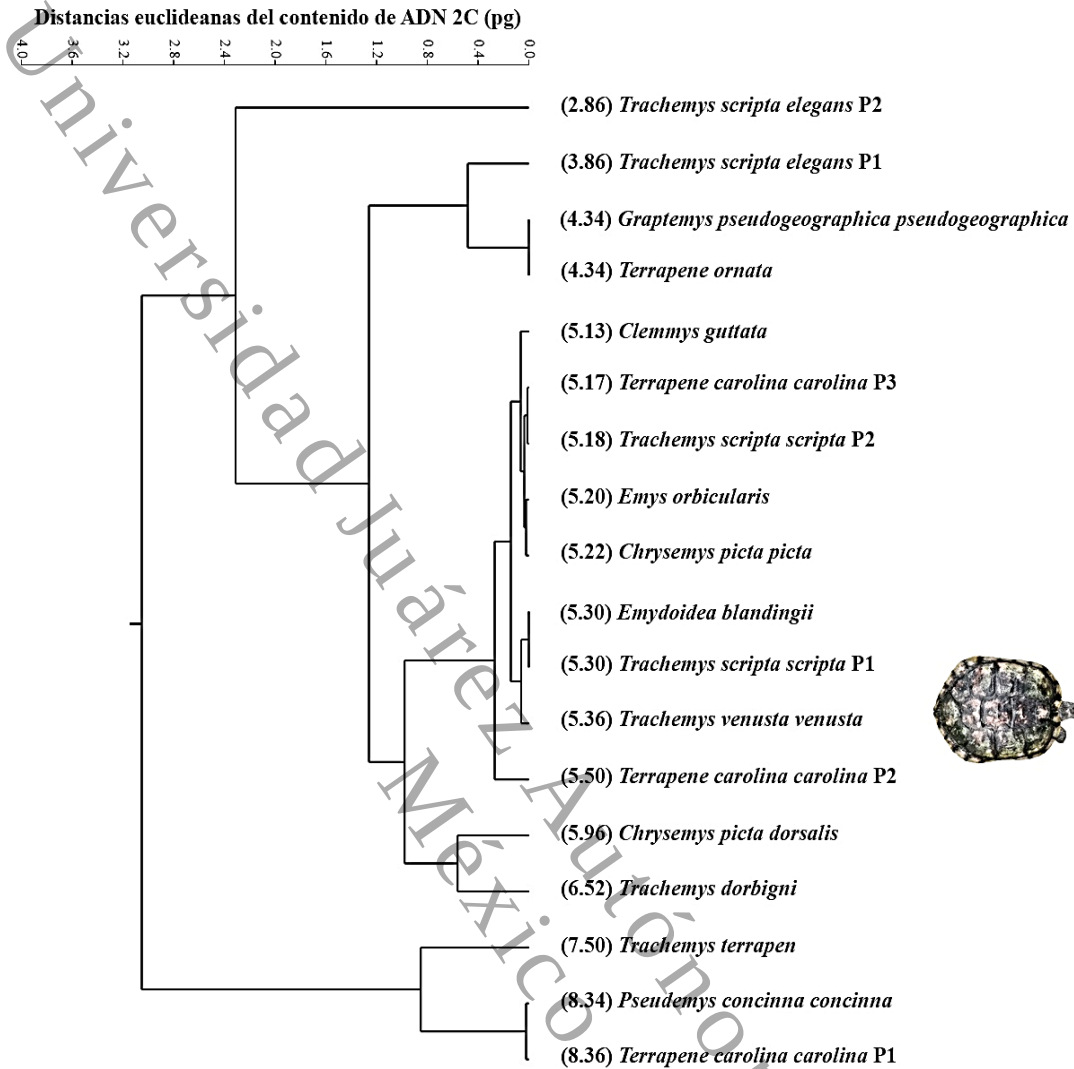


Figura 13. Dendrograma de relación con distancias euclidianas de todos los registros del contenido de ADN o valor 2C (pg) en la familia Emydidae. La fotografía de la tortuga representa a la especie *T. v. venusta* en este estudio.

3.4.5. Familia Geoemydidae

En este grupo la variación del contenido de ADN 2C tiene un comportamiento similar a la familia Emydidae, ya que algunas especies se caracterizan por poseer núcleo interfásico G1 pequeño que va de 2C= 3.64 pg en la tortuga *Mauremys caspica* (De Smet, 1981) a núcleos interfásicos G1 relativamente grandes de acuerdo a los estándares de las tortugas con 2C=8.20 pg en la especie *Heosemys spinosa* (De Smet, 1981; Gregory, 2023). Con respecto

a la tortuga *R. areolata* de Tabasco, no existen otros registros del contenido de ADN 2C en el género *Rhinoclemmys* en el mundo para tener una comparación efectiva, sin embargo, la única especie en la familia con la que tiene mayor similitud es con la tortuga *Melanochelys trijuga trijuga* con 2C= 5.68 (Figura 14) (De Smet, 1981; Gregory, 2023).

Con respecto a las anomalías genéticas, nuestro estudio reveló a dos grupos de individuos con el contenido de ADN 2C atípico; los cuales, con relación al contenido de ADN estándar para *R. areolata* (2C= 5.85 pg) corresponderían a núcleos interfásicos triploides (cuatro individuos) y tetraploides (cuatro individuos). En este caso, planteamos la posibilidad de que este fenómeno ocurrido en *R. areolata* tenga un origen relacionado con la contaminación ambiental de la zona de estudio, ya que, en una de ellas (Villa Luis Gil Pérez, municipio de Centro, Tabasco), existe un antecedente de triploidía en otras especies muy distintas a las tortugas, como es el caso de *R. horribilis* (Hernández-Guzmán et al., 2019), sin embargo, es claro que se requiere otros estudios que comprueben esta hipótesis para la población de *R. areolata* de la Villa Luis Gil Pérez, municipio de Centro, y la localidad La Palma, municipio de Tenosique, Tabasco, México.

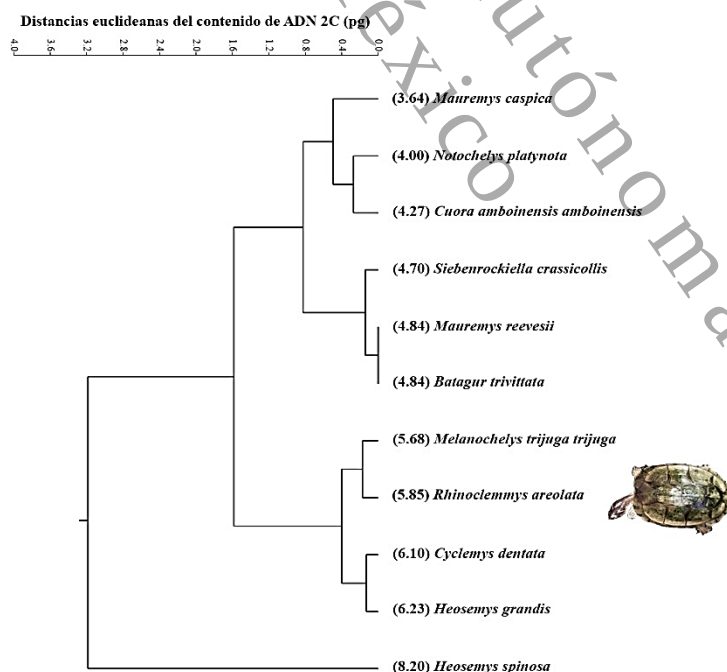


Figura 14. Dendrograma de relación con distancias euclidianas de todos los registros del contenido de ADN o valor 2C (pg) en la familia Geoemydidae. La fotografía de la tortuga representa a la especie *R. areolata* en este estudio.

En conclusión, mostramos una perspectiva genética general del ADN 2C en todas las especies de tortugas dulceacuícolas que se distribuyen en el estado de Tabasco, México, el cual no tiene precedentes. También, se identificaron tortugas con anomalías genéticas como la triploidía, tetraploidía y aneuplodismo, lo cual, no ha sido reportado en las especies involucradas en los estudios previos. Si bien, el origen de estas anomalías genéticas no está claro, proponemos dos hipótesis principales que podrían dar respuesta a estos resultados, como es el caso de la hibridación natural o la exposición a contaminantes genotóxicos; por lo que tenemos una mejor comprensión sobre el contenido de ADN en las tortugas dulceacuícolas de Tabasco. Finalmente recomendamos que se lleven a cabo estudios avanzados en genómica a través de microsatélites y análisis bioquímicos en los ambientes de origen de las tortugas para tener otras perspectivas sobre el posible origen de las anormalidades genéticas aquí encontradas.

3.5. REFERENCIAS

- Arias-Rodriguez, L. 2007. Genetic differentiation of Japanese *Misgurnus loach* inferred from microsatellite variation, marker centromere map and reproduction of hybrids between two populations. Tesis de Doctorado. Hokkaido University. Hokkaido, Japón. 187 p.
- Arias-Rodriguez, L., Indy, J.R., Páramo-Delgadillo, S. & Álvarez-González, C.A. 2019. Avances en el conocimiento genético de la biodiversidad. En: Cruz-Angón, A., Cruz-Medina, J., Valero-Padilla, J., Rodríguez-Reynaga, F.P., Melgarejo, E.D., Mata-Zayas, E.E. & Palma-López, D.J. La biodiversidad en Tabasco, estudio de Estado. Vol. 2. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México, México.
- Baek, S.Y., Shin, C., Kim, K.M., Choi, E.H., Hwang, J., Jun, J., Park, T., Kil, H.J., Suk, H.Y., Min, M.S., Park, Y., Lee, Y. & Hwang, U.W. 2020. COI-based genetic structure of an exotic snapping turtle *Chelydra serpentina* imported to South Korea. *Animal Systematics, Evolution and Diversity*. 36(4): 354-362.
- Barragán-Vázquez, M.R., Ríos-Rodas, L., Fucsko, L.A., Porras, L.W., Mata-Silva, V., Rocha, A., DeSantis, D.L., García-Padilla, E., Johnson, J.D. & Wilson, L.D. 2022.

- The herpetofauna of Tabasco, Mexico: Composition, distribution, and conservation status. *Amphibian & Reptile Conservation*, 16(2): 1-61.
- Caballero, S., Martínez, J.G., Morales-Betancourt, M., Bolaños, N. & Lasso, C.A. 2022. Genomic analyses of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*) (Linnaeus, 1766) in insular and continental Colombia: Evidence for multiple conservation and taxonomic units. *Frontiers in Conservation Science*. 3: 938040.
- D'artola-Barceló, A.L., Arias-Rodriguez, L., Páramo-Delgadillo, S. & Indy, J.R. 2019. Microcromosomas “B” en la sardina (*Astyanax aeneus*). En: Cruz-Angón, A., Cruz-Medina, J., Valero-Padilla, J., Rodríguez-Reynaga, F.P., Melgarejo, E.D., Mata-Zayas, E.E. & Palma-López, D.J. La biodiversidad en Tabasco, estudio de Estado. Vol. 2. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México, México.
- Dai, S.F., Zhu, X.G., Hutang, G.R., Li, J.Y., Tian, J.Q., Jiang, X.H., Zhang, D. & Gao, L.Z. 2022. Genome size variation and evolution driven by transposable elements in the genus *Oryza*. *Frontiers in Plant Science*. 13: 921937.
- Das, D., Singh, S.K., Bierstedt, J., Erickson, A., Galli, G.L.J., Crossley, D.A. & Rhen, T. 2020. Draft genome of the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*, a model for phenotypic plasticity in reptiles. *G3, Genes, Genomes, Genetics*. 10(12): 4299-4314.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M.A., Nardi, L. & Obermayer, R. 1998. Plant genome size stimation by Flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*. 82(A): 17-26.
- Dourado, P.L.R., da Rocha, M.P., Roveda, L.M., Raposo Junior, J.L., Cândido, L.S., Cardoso, C.A.L., Morales, M.A.M., de Oliveira, K.M.P. & Grisolia, A.B. 2017. Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays. *Genetics and Molecular Biology*. 40(1): 123-133.
- Ernst, C.H., & Barbour, R.W. (1989). *Turtles of the world* (1st Edition). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Farkas, B. & Sasvári, L. 1993. Hybriden zwischen *Kinosternon bauri* und *K. subrubrum hippocrepis*. *Salamandra*. 29(2): 140-142.

- Gallardo-Alvárez, M.I., Leshner-Gordillo, J.M., Machkour-M´Rabet, S., Zenteno-Ruiz, C.E., Olivera-Gómez, L.D., Barragán-Vázquez, M.R., Ríos-Rodas, L., Valdés-Marín, A., Vázquez-López, H.G. & Arriaga-Weiss, S.L. 2019. Genetic diversity and population structure of founders from wildlife conservation management units and wild populations of critically endangered *Dermatemys mawii*. *Global Ecology and Conservation*. 19: e00616.
- Gregory, T.R. 2023. Animal genome size database. Consultado: 21/07/2023. En línea: <https://www.genomesize.com/>
- Greilhuber, J. & Doležal, J. 2009. 2C or not 2C: A closer look at cell nuclei and their DNA content. *Chromosoma*, 118: 391-400.
- Hernández-Guzmán, J., Arias-Rodríguez, L., Indy, J.R., Páramo-Delgadillo, S. & Yasui, G.S. 2019. Los cromosomas de la herpetofauna nativa. En: Cruz-Angón, A., Cruz-Medina, J., Valero-Padilla, J., Rodríguez-Reynaga, F.P., Melgarejo, E.D., Mata-Zayas, E.E. & Palma-López, D.J. La biodiversidad en Tabasco, estudio de Estado. Vol. 2. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México, México.
- Hernández-Guzmán, J., Arias-Trinidad, A., Islas-Jesús, R.E., Fraire-Vázquez, A., de la Cruz-Izquierdo, R.I., García-Guzmán, N.C. & Ruiz, X. 2015. Cromosomas, lesión del AND y malformación nuclear en la Tortuga dulceacuícola *Kinosternon leucostomum* (Testudines: Kinosternidae). *The Biologist*. 13(2): 201-211.
- Hernández-Guzmán, J., Indy, J.R., Yasui, G.S. & Arias-Rodríguez, L. 2014. Los cromosomas de las tortugas tropicales: *Kinosternon leucostomum*, *Staurotypus triporcatus* (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). *Revista de Biología tropical*. 62(2): 671-688.
- Iverson, J.B., Le, M. & Ingram, C. 2013. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 69(3): 929-939.
- Killebrew, F.C. 1975. Mitotic chromosomes of turtles. III The Kinosternidae. *Herpetologica*. 31(4): 398-403.
- Legler, J., & Vogt, R.C. (2013). The turtles of Mexico: Land and freshwater forms. (1st Edition). Berkeley: University of California Press.

- Lockwood, S.F., Seavey, B.T., Dillinger, R.E. & Bickham, J.W. 1991. Variation in DNA content among age classes of broad whitefish (*Coregonus nasus*) from the Sagavanirktok River delta. *Canadian Journal of Zoology*. 69(5): 1335-1338.
- López-Hernández, J.C. 2017. Biología, fisiología espermática básica y efecto de la radiación ultravioleta sobre la fisiología e integridad de las células espermáticas del bagre tropical *Rhamdia laticauda*. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 136 p.
- López-Luna, M.A., Venegas-Anaya, M., Cupul-Magaña, F.G., Rangel-Mendoza, J.A. & Escobedo-Galván, A.H. (2021). Mitochondrial DNA data support the recognition of the mud turtle, *Kinosternon vogti* (Cryptodira: Kinosternidae). *Chelonian Conservation and Biology*, 20(1): 97-102. Doi: <https://doi.org/10.2744/CCB-1387.1>
- McCord, W.P., Joseph-Ouni, M., Hagen, C. & Blanck, T. 2010. Three news subspecies of *Trachemys venusta* (Testudines: Emydidae) from Honduras, Northern Yucatán (Mexico), and Pacific coastal Panama. *Reptilia*. 71: 39-49.
- Mirsky, A.E. & Ris, H. 1951. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *The Journal of General Physiology*. 34(4): 451-462.
- Musálem-Castillejos, K., Laino-Guanes, R., Bello-Mendoza, R., González-Espinosa, M. & Ramírez-Marcial, N. 2018. Water quality of the Grijalva river on the Chiapas – Tabasco border. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 5(13): 55-64.
- Pacheco-Sierra, G., Vázquez-Domínguez, E., Pérez-Alquicira, J., Suárez-Atilano, M. & Domínguez-Laso, J. 2018. Ancestral hybridization yields evolutionary distinct hybrids lineages and species boundaries in crocodiles, posing unique conservation conundrums. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 6: 138.
- Parham, J.F., Papenfuss, T.J., Sellas, A.B., Estuardo, B.L. & Simison, W.B. 2020. Genetic variation and admixture of red eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) in the USA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 145: 106722.
- Parham, J.F., Papenfuss, T.J., van Dijk, P.P., Wilson, B.S., Marte, C., Rodriguez-Schettino, L. & Simison, W.B. 2013. Genetic introgression and hibridization in Antillean freshwater turtles (*Trachemys*) revealed by coalescent analyses of mitochondrial and cloned nuclear markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67(1): 176-187.

- Pavelka, N., Rancati, G., Zhu, J., Bradfort, W.D., Saraf, A., Florens, L., Sanderson, B.W., Hattem, G.L. & Li, R. 2010. Aneuploidy confers quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeast. *Nature*. 468(7321): 321-325.
- Polisar, J. & Horwich, R.H. 1994. Conservation of the large, economically important river turtle *Dermatemys mawii* in Belize. *Conservation Biology*. 8(2): 338-340.
- Pooley, S., Sirosky, P.A., Fernandez, L., Sideleau, B. & Ponce-Campos, P. 2021. Human-crocodilian interactions in Latin America and the Caribbean region. *Conservation Science and Practice*. 3(5): e351.
- Ramos-Herrera, S., Broca-Martínez, L.F., Laines-Canepa, J.R. & Carrera-Velueta, J.M. 2012. Tendencia de la calidad del agua en ríos de Tabasco, México. *Ingeniería*. 16(3): 207-217.
- Recino-Reyes, E.B., Leshner-Gordillo, J.M., Machkour-M'Rabet, S., Gallardo-Álvarez, M.I., Zenteno-Ruiz, C.E., Olivera-Gómez, L.D., Valdés-Marín, A., Gómez-Carrasco, G., Ríos-Rodas, L., Barragán-Vázquez, M.R. & Hernández-Martínez, R. 2020. Conservation and management of *Trachemys venusta venusta* in Southern Mexico: A genetic approach. *Tropical Conservation Science*. 13: 1-20.
- Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., Bour, R., Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H.B., & van Dijk, P.P. (2021). Turtles of the world. Annotated checklist and Atlas of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. *Chelonian Research Monographs*. 8: 1-472.
- Romero-Calderón, A.G., Morales-Vela, B., Rosiles-Martínez, R., Olivera-Gómez, L.D. & Delgado-Estrella, A. 2016. Metals in bone tissue of Antillean manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal bay, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 96(1): 9-14.
- SEMARNAT. 2019. Modificación del anexo normativo III, lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación "DOF". En línea: [https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019#gsc](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019#gsc.tab=0).tab=0

- Serb, N.M., Phillips, C.A. & Iverson, J.B. 2001. Molecular phylogeny and biogeography of *Kinosternon flavescens* based on complete mitochondrial control region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18(1): 149-162.
- Smith, H.M., & Smith, R.B. (1979). Synopsis of the Herpetofauna of Mexico: Guide to Mexican turtles: Bibliographic addendum III, Volume VI (1st Edition). Coopersburg: John Johnson.
- Soria-Ortiz, G.J., García-Navarrete, P.G., Ochoa-Ochoa, L.M. & Rincón-Gutiérrez, A. 2022. Potential distribution of hybrids between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* of the Mexican Pacific coast outside the natural hybridisation zone. *Herpetological Journal*. 32(3): 93-101.
- Spinks, P.Q., Thomson, R.C., Gidiş, M. & Shaffer, H.B. 2014. Multilocus phylogeny of the new-world mud turtles (Kinosternidae) supports the traditional classification of the group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 76: 254-260.
- Srikulnath, K., Thapana, W. & Muangmai, N. 2015. Role of chromosome changes in *Crocodylus* evolution and diversity. *Genomics and Informatics*. 13(4): 102-111.
- Upadhyay, A., Pandya, P., Salunke, A. & Parikh, P. 2022. Herbicide pyrazosulfuron ethyl induces genotoxicity, cell cycle alterations and apoptosis in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture, Fish and Fisheries*. 2(4): 287-295.
- Zar, J. (1984). *Biostatistical Analysis*, Fifth Edition, New York: Prentice Hall.
- Zenteno-Ruiz, C.E., Rangel-Mendoza, J.A., Triana-Ramírez, D.I. & Méndez-Sánchez, C.A. 2019. Aportaciones al conocimiento sobre tortugas dulceacuícolas desde la División Académica de Ciencias Biológicas: Una revisión retrospectiva. *Kuxulkab´*. 25(53): 13-25.
- Zhu, J., Tsai, H.J., Gordon, M.R. & Li, R. 2018. Cellular stress associated with aneuploidy. *Developmental Cell*. 44(4): 420-431.
- Olmo, E. 1976. Genome size in some reptiles. *Journal of Experimental Zoology*, 195(2): 305-310.
- De Smet, W.H.O. 1981. The nuclear Feulgen DNA content of the vertebrates (specially reptiles), as measured by fluorescence cytophotometry, with notes on the cell and chromosome size. *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia*. 76: 119-167.

- Tiersch, T.R., Chandler, R.W., Wachtel, S.S. & Elias, S. 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry*. 10: 706-710.
- Vinogradov, A.E. 1998. Genome size and GC-Percent in vertebrates as determined by flow cytometry: The triangular relationship. *Cytometry*. 31(2): 100-109.
- Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H. & Greilhuber, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*. 51A: 127-128.
- Doležel, J. y Bartoš, J. 2005. Plant DNA Flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*. 95: 99-110.
- Greilhuber, J., Doležel, J., Lysák, M.A. & Bennett, M.D. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-Value” to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*. 95(1): 255-260.
- Greilhuber, J. 2008. Cytochemistry and C-values: The less-well-known world nuclear DNA amounts. *Annals of Botany*. 101(6): 791-804.
- Doležel, J. & Greilhuber, J. 2010. Nuclear genome size: are we getting closer?. *Cytometry Part A*. 77A: 635-642.
- Kasai, F., O'Brien, P.C.M. & Ferguson-Smith, M.A. 2012. Reassessment of genome size in turtle and crocodile based on chromosome measurement by flow karyotyping: close similarity to chicken. *Biology Letters*. 8(4): 631-635.
- Sheltzer, J.M., Torres, E.M., Dunham, M.J. & Amon, A. 2012. Transcriptional consequences of aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(31): 12644-12649.
- Sigler, L. & Gallegos-Michel, J. 2017. El conocimiento sobre el cocodrilo de morelet *Crocodylus moreletii* (Duméril y Duméril 1851) en México, Belice y Guatemala. Los autores. Ciudad de México, México.
- Núñez-Nogueira, G. y Uribe-López, M. 2020. Losing mexican manatees. *Science*. 367(6475): 257.
- Thompson, R.C., Spinks, P.Q. & Shaffer, H.B. 2021. A global phylogeny of turtles reveals a burst of climate-associated diversification on continental margins. *PNAS*. 118(7): e2012215118.

Salcedo-Garduño, M.G., Galaviz-Villa, I. & Pérez-Vazquez, A. 2022. Determining water quality of the lower basin of the Usumacinta River in Tabasco. *Agro Productividad*. 15(8): 23-31.

Arias-Rodriguez, L., Ibarra-Castro, L. & Páramo-Delgadillo, S. 2008. Los cromosomas mitóticos y meióticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae). *Revista de Biología Tropical*. 56(2): 895-907.

ANEXO I

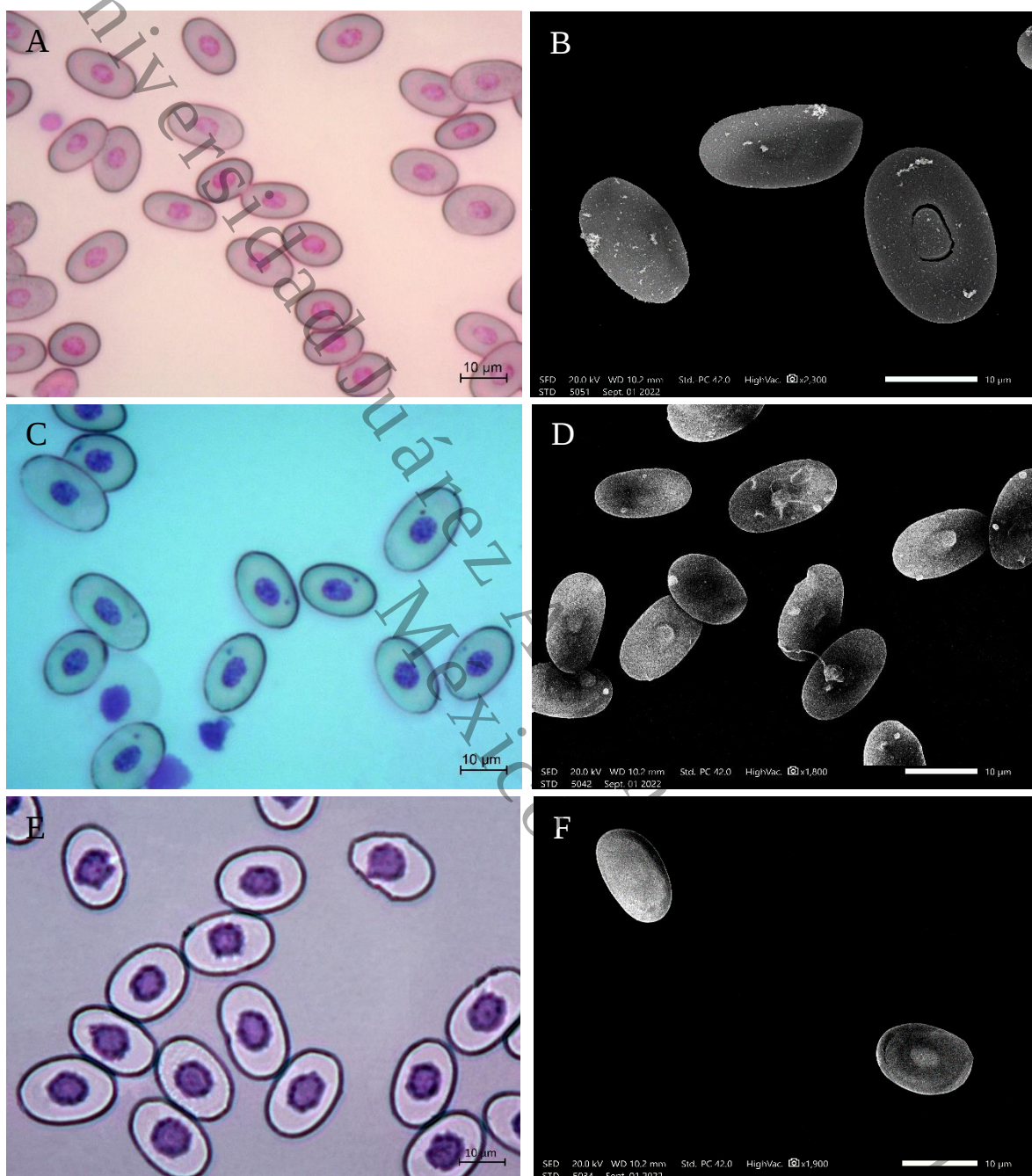


Lámina I. Eritrocitos con tinción convencional de Giemsa y microscopía electrónica de barrido (MEB) en las tortugas *K. l. leucostomum* (A, B), *K. acutum* (C, D) y *K. s. cruentatum* (E, F).

ANEXO II

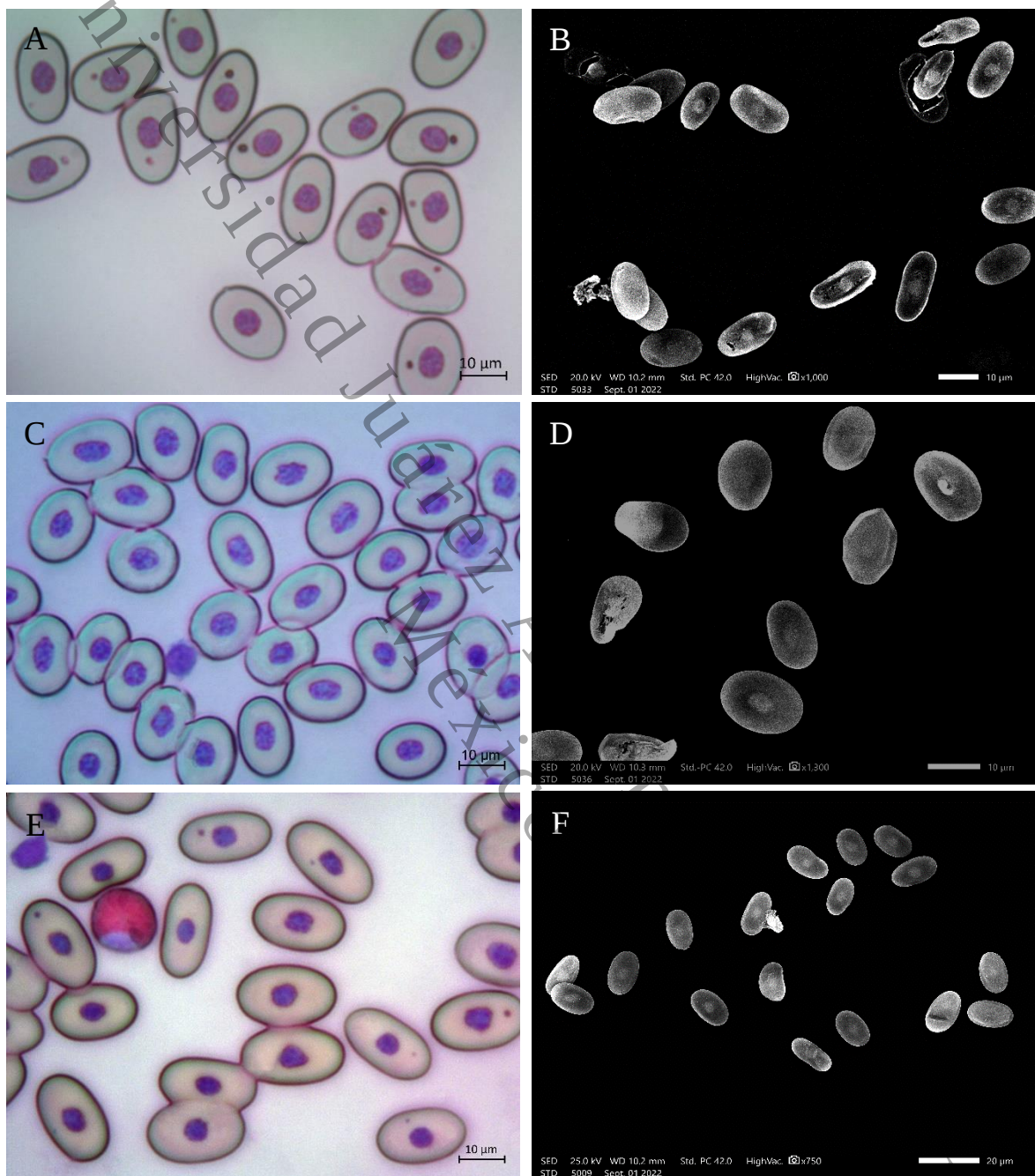


Lámina II. Eritrocitos con tinción convencional de Giemsa y microscopía electrónica de barrido (MEB) en las tortugas *S. triporcatus* (A, B), *C. angustatus* (C, D) y *C. rossignonii* (E, F).

ANEXO III

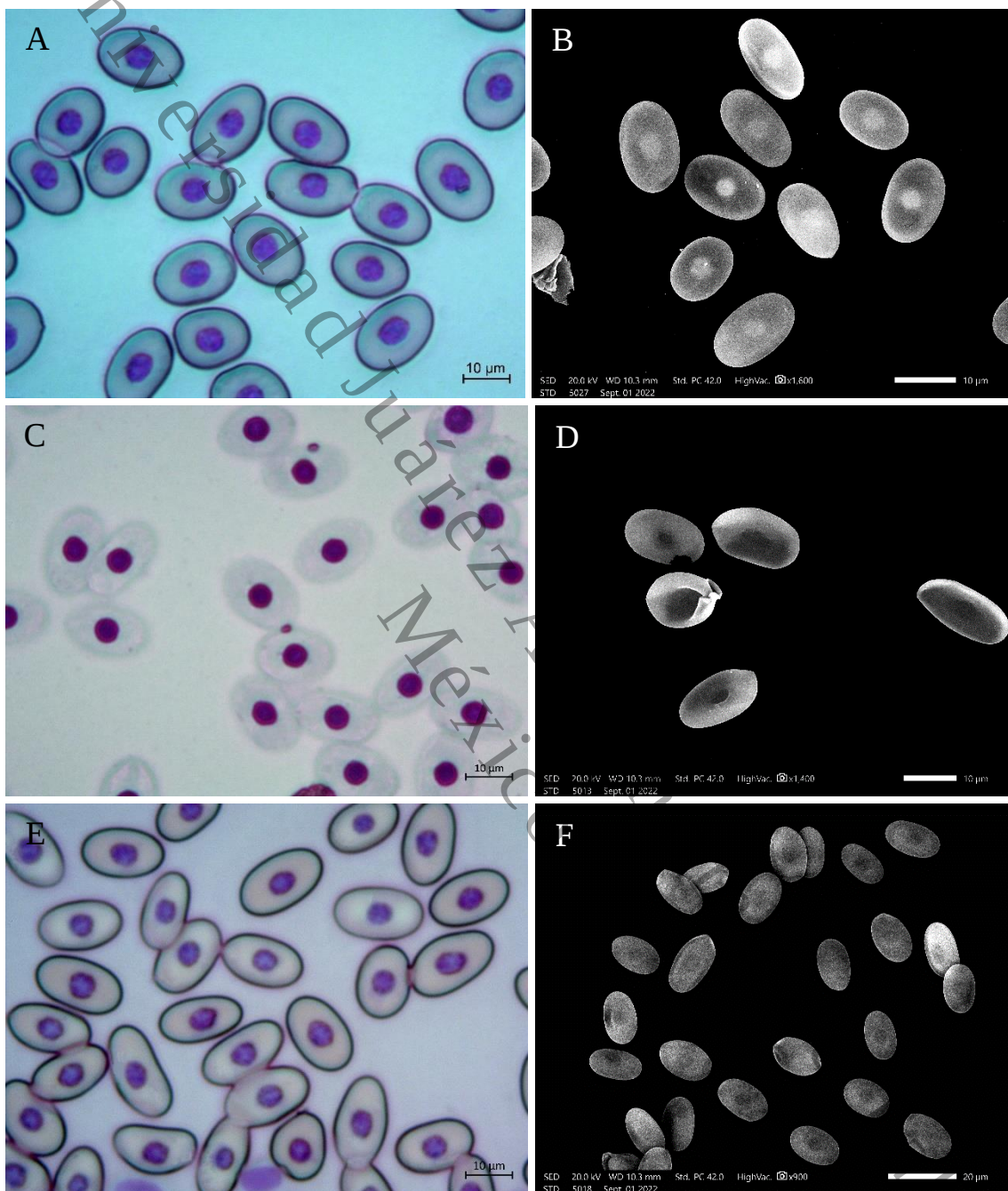


Lámina III. Eritrocitos con tinción convencional de Giemsa y microscopía electrónica de barrido (MEB) en las tortugas *R. areolata* (A, B), *D. mawii* (C, D) y *T. v. venusta* (E, F).

CAPÍTULO IV

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO “*IN VITRO*” DE LINFOCITOS EN LAS TORTUGAS DULCEACUÍCOLAS *Kinosternon leucostomum leucostomum*, *K. acutum* Y *K. scorpioides cruentatum*

Javier Hernández-Guzmán¹ & Lenin Arias-Rodriguez¹

Resumen: Las tortugas son especies que tienen diferentes temperaturas preferenciales, por lo que hay algunas tortugas que prefieren temperaturas frías y otras temperaturas templadas. Existen diferentes protocolos para el cultivo *in vitro* de sangre periférica en tortugas, sin embargo, estos métodos están diseñados para especies con distribución y preferencia de temperatura baja. El objetivo es estandarizar algunos parámetros para un protocolo de cultivo *in vitro* de linfocitos, utilizando como modelo biológico a las tortugas dulceacuícolas tropicales *Kinosternon leucostomum leucostomum*, *K. acutum* y *K. scorpioides cruentatum*. Se demostró que la temperatura óptima para el cultivo *in vitro* de linfocitos es de 28 °C, alcanzando su mayor tasa de productividad celular a 72 h en las tres especies de tortugas dulceacuícolas. En este estudio se descarta el uso de temperatura a 25 °C para el cultivo de linfocitos en posteriores investigaciones, y se recomienda que el tiempo del cultivo no exceda 80 h, ya que es cuando la fase estacionaria inicia su proceso de decrecimiento en la reproducción celular. Con la aplicación de dichos parámetros, se podrá implementar un protocolo de cultivo *in vitro* de células linfocitarias óptimo para tortugas de clima tropical.

Palabras clave: Células, cultivo celular, *in vitro*, linfocitos, tortugas tropicales.

¹División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa- Cárdenas Km. 0.5 S/N, Entronque a Bosques de Saloya, CP. 86150, Villahermosa, Tabasco, México.

Enviado a: The Biologist

Nombre de la Editorial: Universidad Nacional Federico Villarreal

Fecha de envío programada: 30 de marzo de 2026

4.0 ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO “IN VITRO” DE LINFOCITOS EN LAS TORTUGAS DULCEACUÍCOLAS *Kinosternon* *leucostomum leucostomum*, *K. acutum* Y *K. scorpioides cruentatum*

Abstract: Turtles are species with varying temperature preferences, with some preferring cold temperatures and others warm temperatures. This preference also influences the production of specialized cells such as lymphocytes. Several protocols exist for the in vitro culture of peripheral blood in turtles; however, these methods are designed for species with a low temperature distribution and preference. The aim of this study was to standardize parameters for an in vitro lymphocyte culture protocol using the tropical freshwater turtles *Kinosternon leucostomum leucostomum*, *K. acutum*, and *K. scorpioides cruentatum* as biological models. The optimal temperature for in vitro lymphocyte culture was shown to be 28 °C, with the highest cell productivity rate achieved at 72 h in all three freshwater turtle species. This study rules out the use of 25 °C for lymphocyte culture in future research and recommends that the culture time not exceed 80 h, as this is when the stationary phase begins its decline in cell reproduction. With the application of these standardized parameters, an optimal in vitro lymphocyte culture protocol for tropical turtles can be implemented.

Keywords: Cells, cell culture, in vitro, lymphocytes, tropical turtles.

4.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo celular es una técnica con diversas aplicaciones, desde el uso como una herramienta de estudio para el diagnóstico médico humano, diagnóstico veterinario y su uso en la investigación biológica y genética de aspectos básicos y aplicados (Bianchi & van Wijk 2021; Connor et al., 2021).

Las células cultivadas por el método “*in vitro*” fue iniciado por Jolly en 1903 y Ross Harrison en 1906, es decir, a principios del siglo XX con sus experimentos de sobrevivencia de células y división celular de leucocitos en salamandra y experimento en fibras nerviosas de ranas respectivamente, dicho trabajos magistrales fueron publicados en 1903 con el título de “*Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors l’organisme*” y en 1906 con el título de “*Observations on the living developing nerve fiber*” (Jolly, 1903; Harrison, 1906; Abercrombie, 1961; Jedrzejczak-Silicka, 2017).

Los avances en el cultivo celular convencional han evolucionado desde entonces con las nuevas biotecnologías, como es el caso del cultivo de células sanguíneas bidimensional o 2D, así como por el método de impresión 3D, los cuales, se han desarrollado por la alta demanda en la biomedicina por problemas relacionados con la donación de sangre y la escasez de plasma en los centros hospitalarios (Bhagat & Singh, 2022; Kweon et al., 2023). De la misma manera, los protocolos de cultivo celular sanguíneo siguen actualizándose con pruebas experimentales, desde el mejoramiento de rendimiento de células (Claessen et al., 2024), hasta la eficiencia de lectura de CO₂ en los cultivos celulares para el control de pH de las muestras (Yang & Balcarcel, 2004; Dubey et al., 2021). Sin embargo, estos avances son enfocados al comportamiento y la mecánica de células humanas, mamíferos y aves, mientras que en especies de reptiles se carecen de técnicas especie específicas (Golkar-Narenji et al., 2023).

La carencia de técnicas de cultivo celular para especies específicas de reptiles puede estar relacionada con la naturaleza poiquilotérmica de dicho grupo de vertebrados, ya que, a diferencia de los mamíferos y aves, en los reptiles existe un rango mucho mayor del posible éxito reproductivo de las células que están relacionadas con la variación de temperatura y los días de cultivo (Clark, 1973). Lo anterior es sustentado por diversos reportes, señalando que las tortugas dulceacuícolas tropicales tienen variaciones preferenciales de temperatura, entre 25 y 28 °C como en la tortuga de río Krefft *Emydura macquarii krefftii* de Australia (Kidman

et al., 2023) y la tortuga cabezona *Platysternon megacephalum* de China (Shen et al., 2013), mientras otras especies como la tortuga de oreja roja *Trachemys scripta* de Estados Unidos de América prefiere temperaturas de 29 °C (Ulsh et al., 2001) y la tortuga de caparazón blando espinosa *Apalone spinifera* que se distribuye en Estados Unidos de América y el norte de México han registrado rangos superiores a los 30 °C (Tamplin et al., 2020).

Dichas variaciones en la temperatura corporal y diferencias fisiológicas de las especies de tortugas dulceacuícolas en distintas zonas geográficas en el mundo, plantea incógnitas sobre la temperatura ideal en los cultivos celulares *in vitro*, ya que los protocolos actuales son basados en metodologías aplicadas a mamíferos, los cuales están muy bien establecidos, a diferencia de los reptiles (Ulsh et al., 2001).

Por lo anterior, en este trabajo de investigación se planteó elaborar un experimento de temperatura óptima de cultivo celular (linfocitos) *in vitro* en tres especies de tortugas dulceacuícolas, los pochitoques *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum* del estado de Tabasco, México, con el objetivo de estandarizar un protocolo de cultivo para tortugas tropicales en la región mesoamericana.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Área de estudio y recolecta de especímenes

Se recolectaron 30 individuos de tortugas pochitoques tropicales por observación visual en ambiente silvestre, el pochitoque común *K. l. leucostomum* (10: cinco hembras y cinco machos), el pochitoque jahuactero *K. acutum* (10: seis hembras y cuatro machos) y el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* (10: siete hembras y tres machos). Las tortugas fueron observadas y recolectadas manualmente de las lagunas del Pueblo y Huapacal de la Villa Luis Gil Pérez, así como el área conservada de tintal de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco “UJAT” en el municipio del Centro y de los humedales del poblado Federico Álvarez, municipio de Jonuta, todas las localidades del estado de Tabasco, México. Los individuos recolectados, se mantienen vivos y en condiciones óptimas de mantenimiento, calidad de agua y alimentación en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la UJAT.

La identificación taxonómica, se basó en la nomenclatura de Legler y Vogt (2013), y atendiendo la última actualización en taxonomía, sinonimia, distribución, estatus de

conservación y lista anotada de las especies de tortugas dulceacuícolas en el mundo (Rhodin et al., 2021).

Todas las especies fueron tratadas de acuerdo a los estándares bioéticos nacionales, cumpliendo con las normas oficiales mexicanas NOM-126-SEMARNAT-2000 y NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2019). Este documento se realizó con el permiso federal de colecta de SEMARNAT SGPA/DGVS/04315/11, y con la aprobación de la Comisión Institucional de Ética en Investigación “CIEI” con número de Folio: 0985, por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en México.

4.2.2. Procedimiento de cultivo *in vitro*

La técnica de cultivo *in vitro* de sangre periférica de linfocitos que se utilizó es la de Fujiwara et al. (2001) una técnica general para organismos acuáticos, atendiendo las modificaciones de Rohilla et al. (2006) para tortugas dulceacuícolas y Majtánová et al. (2017) para organismos acuáticos. El diseño experimental fue elaborado por triplicado de acuerdo con la recomendación experimental de Keller et al. (2005) aplicado en cada especie y con las variables señaladas en la Tabla 7. La técnica aplicada consistió en lo siguiente: se extrajo 1 ml de sangre de la vena coccígea con una jeringa previamente heparinizada (Inhepar®) con aguja ultrafina de 6 mm y con capacidad de 100 unidades (1 ml) y desinfectando la zona de punción con etanol 70% (Haskell & Pokras, 1994). El aislamiento de linfocitos consistió en añadir 3 ml de Ficol (Ficoll-Paque™ Plus 1.077±0.001 g/ml a 20 °C de GE Healthcare) a tubos de ensayo de 14 ml preparado previamente con 4 ml de la muestra sanguínea diluida en disolución salina en proporción 1:1 (sin mezclar el Ficol con la muestra sanguínea diluida). Los tubos fueron esterilizados previamente en una cámara de PCR UV 825-UVC (PlasLabs, Lansing, Michigan, USA) utilizando las lámparas germinicidas fluorescentes y luz ultravioleta durante 15 min. Luego se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm, seguidamente se extrajo el sobrenadante de plasma con la ayuda de micropipetas para dejar expuesto a la capa de células mononucleares.

Tabla 7. Diseño experimental para el desarrollo de procedimiento de cultivo “*in vitro*” de sangre periférica de las tortugas *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum*.

Tratamiento	Sangre periférica	Aislamiento de linfocitos	Medio de cultivo	Antibiótico	Fitohematoglutinina	Temperatura	Replicas Por especie
Control/a	Si	No	No	Si	No	25°C	3
A I	Si	Si	Si	Si	Si	25°C	3
Control/b	Si	No	No	Si	No	28°C	3
B I	Si	Si	Si	Si	Si	28°C	3

Una vez extraído el plasma, con una jeringa estéril nueva se extrajo la capa de células mononucleares y se transfirió a un nuevo tubo con Medium preparado, que consistió en 5 ml de Medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (KREAvital Lymphocyte Karyotyping Medium que incluye PHA pKBI-90021 de Kreatech), 1% de solución antibiótica antimicótica con proporción de 0.5 mg/5 ml de Medio, Fitohemaglutinina-P (Lectina de *Phaseolus vulgaris* de Sigma-Aldrich®) en proporción 90 mg/5 ml de Medio, Benzatina bencilpenicilina (solución antibacteriana de Amsa Laboratorios®) con 0.3 mg/5 ml de Medio y 0.175 µl de metanol al 10%.

Las muestras de células blancas se dejaron en incubación por 144 h a temperaturas de 25 y 28 °C en una incubadora Ecoshel DH2500AB de convección natural, monitoreando los siguientes parámetros: niveles de Dióxido de Carbono (CO₂ en ppm), Temperatura (T en °C), Humedad Relativa (HR en porcentaje %) y Compuestos Orgánicos Volátiles Totales (TVOC en mg³/m³), parámetros que son fundamentales durante el desarrollo del cultivo celular y a como se describe en la Figura 15. Las horas de incubación fueron implementadas de acuerdo con los registros estandarizados previamente en diferentes especies de tortugas como *T. scripta* por Ulsh et al. (2001) y *Chelonoidis carbonaria* por Silva et al. (2011), tomando en consideración el patrón de crecimiento de células en cultivo, el cual se caracteriza por las siguientes fases: 1) Fase de retraso, que es un período de crecimiento lento en el que las células se adaptan al medio de cultivo. 2) Fase logarítmica, cuando las células proliferan exponencialmente y consumen los nutrientes del medio para el crecimiento. 3) Fase estacionaria, cuando se agotan los recursos nutrimentales del medio y la proliferación se reduce drásticamente o cesa por completo (Mani, 2023). Por otra parte, las temperaturas (25 y 28 °C) fueron establecidas de acuerdo con las características poiquilotérmicas de este grupo de vertebrados y a los estudios previos de temperatura preferencial en tortugas dulceacuícolas

tropicales, publicados por Shen et al. (2013) y Kidman et al. (2023). Mientras que los parámetros de TVOC fueron monitoreados para dar un seguimiento óptimo sobre el comportamiento de estos gases, para detectar contaminación y proliferación de bacterias en el cultivo (Reese et al., 2020; Euler et al., 2022). El CO₂ por otra parte, fue monitoreado para evitar el desbalance en los niveles de pH en el cultivo celular sanguíneo (Yang & Xiong, 2012; Mani, 2023).

Los tubos del cultivo celular fueron agitados con ligereza durante repetidas ocasiones al día para favorecer la dispersión celular, la oxigenación y evitar la concentración o traslape de células en un punto específico del tubo (Prakash & Srivastava, 2008; Gallego-Murillo et al., 2022). Además, las propiedades celulares de las tortugas generan adherencia a las paredes de poliestireno con las que están elaborados los tubos de ensayo empleados en este cultivo, similar a lo reportado por Ulsh et al. (2001).

Al finalizar la incubación, con la ayuda de una micropipeta se añadió 40 µl aproximadamente de células blancas en portaobjetos, donde se realizó el frotis aplicando la técnica de Perpiñán et al. (2006), utilizando portaobjetos de borde biselado y haciendo ángulo de 30° se extendió la muestra por capilaridad. Después de este procedimiento, las muestras se colocaron sobre recipientes de propileno a temperatura ambiente para facilitar el secado y se dejaron envejecer por 24 h. Después, las muestras fueron fijadas con etanol desnaturalizado con benzoato de denatonio (0.7 mg/100 ml) a 4 °C durante 1 min y dejando secar a temperatura ambiente, luego se realizó la tinción con Giemsa madre dejando a exposición durante 10 s, para luego ser lavadas con agua destilada y retirar los excesos del colorante, dejando secar a temperatura ambiente.

4.2.3. Microscopía óptica y conteo celular

Se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss®, equipado con cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®), utilizando el objetivo de 10x para la búsqueda de dispersiones celulares de linfocitos y el objetivo de 40x + 1.25x optovar para la toma de microfotografías. Las mejores imágenes fueron seleccionadas y tratadas para su optimización en el software ZEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011). El conteo de linfocitos, fue elaborado con el software ImageJ 1.53t (National Institutes of Health, USA) aplicando las herramientas de

conteo por puntos individuales y con trazo de cuadrícula con $575 \mu\text{m}^2$. Las matrices de conteo celular se llevaron a cabo con Microsoft® Office Excel LTSC Profesional Plus 2021.

4.2.4. Análisis de datos y estadísticos

Los valores obtenidos, se registraron en bases de datos individuales y les fueron calculados, el promedio $\bar{X}$ y la desviación estándar (D.E.) con el empleo del programa Excel para Windows (Microsoft® 2022).

Los conteos celulares promedios fueron analizados en acuerdo al cumplimiento de las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk; y en el caso de observarse diferencias significativas (cuando $P \leq 0.05$), se aplicó la prueba de Dunnett's a $P \leq 0.05$ (Dunnett, 1955; Dunnet, 1964), en todos los casos se empleó el programa SigmaPlot® (12.3 de Systat Software Inc®).

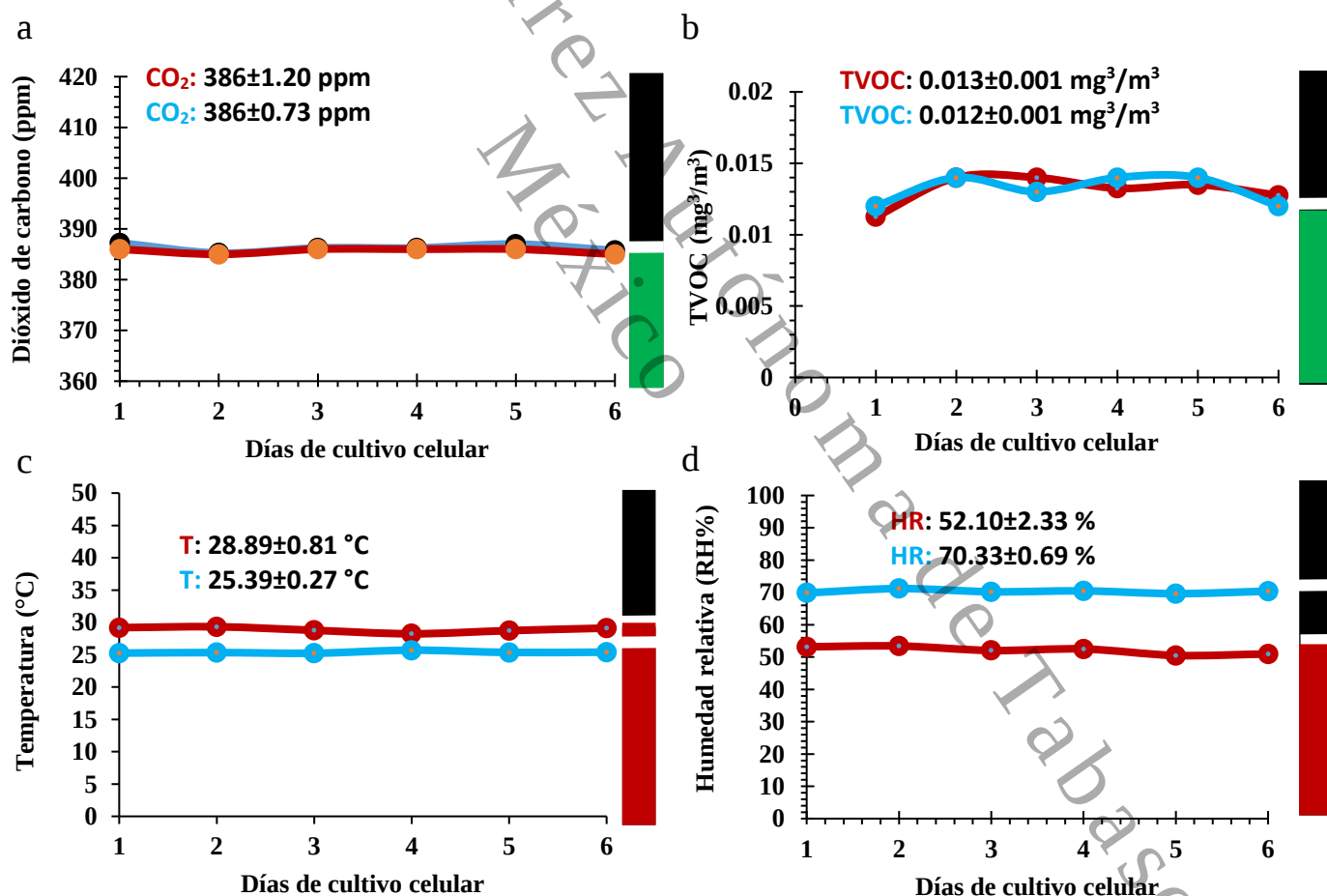


Figura 15. Parámetros monitoreados en la incubación de células mononucleares: CO₂ (a), TVOC (b), Temperatura (c), Humedad relativa (d).

4.3. RESULTADOS

En este estudio fue posible contabilizar 31200 linfocitos en total, de los cuales, en el pochitoque común *K. l. leucostomum* fueron analizadas 11621 linfocitos (control a: 1236, experimento AI: 1487 linfocitos; control b: 2697, experimento BI: 6201 linfocitos). Se determinó que el cultivo de células con mayor éxito reproductivo fue el experimento con las variables B1 a temperatura de 28 °C con diferencias significativas ($P=0.05$) con respecto a la muestra control “b” y a cada día del cultivo celular. El pico de reproducción de células más alto ocurrió al tercer día del cultivo (72 h) con promedio de 62 ± 1.34 linfocitos vs control “b” con promedio de 38 ± 2.05 linfocitos. Asimismo, el experimento con las variables B1 presentaron diferencias significativas ($P=0.05$) con respecto al control “a” y al experimento con las variables A1 de 25 °C. En contraste, el control “a” vs las variables A1 no presentaron diferencias significativas, además, se observó la reducción de la reproducción celular a partir del tercer día de cultivo, situación que también fue observada en los cultivos a 28 °C, pero a partir del cuarto día del cultivo celular. El pico de reproducción de células más alto en las variables A1 (25 °C) fue de tan solo 24 ± 2.33 linfocitos en promedio vs control “a” con 17 ± 1.77 linfocitos en promedio.

Por otro lado, en el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* se analizaron 10205 linfocitos (control a: 1155, experimento AI: 1204 linfocitos; control b: 2622, experimento BI: 5224 linfocitos). En esta especie se determinó que el cultivo de células con mayor éxito reproductivo fue el experimento con las variables B1 a temperatura de 28 °C con diferencias significativas ($P=0.05$) con respecto a la muestra control “b” y a cada día del cultivo celular. El pico de reproducción de células más alto ocurrió al tercer día del cultivo (72 h) con promedio de 66 ± 2.47 linfocitos vs control “b” con promedio de 39 ± 2.69 linfocitos. El experimento llevado a cabo en el pochitoque escorpión con las variables B1 presentaron diferencias significativas ($P=0.05$) con respecto al control “a” y al experimento con las variables A1 de 25 °C. En comparación, el control “a” vs las variables A1 no presentaron diferencias significativas, observándose la reducción de la reproducción celular a partir del tercer día de cultivo, este comportamiento también fue observado en los cultivos de 28 °C, a partir del cuarto día del cultivo celular. El pico de reproducción de células más alto en las variables A1 (25 °C) fue de tan solo 19 ± 1.98 linfocitos en promedio vs control “a” con 17 ± 2.76 linfocitos en promedio.

En cuanto al pochitoque jahuactero *K. acutum* fueron analizadas 9374 linfocitos (control a: 1396, experimento AI: 1430 linfocitos; control b: 2529, experimento BI: 4019 linfocitos). Al igual que en las otras dos especies *K. l. leucostomum* y *K. s. cruentatum* se determinó que el cultivo de células con mayor éxito reproductivo fue el experimento con las variables B1 a temperatura de 28 °C con diferencias significativas ($P=0.05$) con respecto a la muestra control “b” y a cada día del cultivo celular. El pico de reproducción de células más alto ocurrió al tercer día del cultivo (72 h) con promedio de 62 ± 1.34 linfocitos vs control “b” con promedio de 47 ± 2.90 linfocitos. Asimismo, el experimento con las variables B1 presentaron diferencias significativas ($P=0.05$) con respecto al control “a” y al experimento con las variables A1 de 25 °C. En contraste, el control “a” vs las variables A1 no presentaron diferencias significativas, además, se observó la reducción de la reproducción celular a partir del tercer día de cultivo, situación que también fue observada en los cultivos a 28 °C, pero a partir del cuarto día del cultivo celular. El pico de reproducción de células más alto en las variables A1 (25 °C) fue de tan solo 23 ± 1.27 linfocitos en promedio (al segundo día de cultivo) vs control “a” con 17 ± 1.77 linfocitos en promedio (al segundo día de cultivo). Dicho comportamiento se observó en las tres especies de tortugas dulceacuícolas *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum*.

Tabla 8. Promedio del conteo de linfocitos por día de cultivo y desviación estándar del cultivo celular a 25 °C vs 28 °C en la tortuga pochitoque común *K. l. leucostomum*.

Cultivo de linfocitos a 25 °C												
	Control a						A I					
	(X̄) Linfocitos por día±D.E.						(X̄) Linfocitos por día±D.E.					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
KI-1	20±2.12	23±0.71	18±1.41	14±3.54	5±0.00	1±1.41	18±2.12	25±2.83	21±2.83	10±2.83	3±2.12	1±0.00
KI-2	17±2.83	18±4.24	13±2.12	12±2.83	4±0.71	1±0.00	16±1.41	27±2.12	18±2.12	12±1.41	5±2.12	2±0.71
KI-3	16±0.71	18±1.41	7±2.12	8±0.71	6±2.12	3±0.71	15±3.54	24±2.83	20±2.12	13±0.00	4±2.12	1±0.71
KI-4	12±1.41	22±2.12	11±2.12	10±2.12	5±0.00	1±1.41	16±0.71	26±1.41	17±3.54	13±3.54	5±5.66	3±0.71
KI-5	18±2.12	13±2.12	16±0.71	14±1.41	5±2.12	1±0.71	13±2.12	22±3.54	14±3.54	15±1.41	6±1.41	3±0.71
KI-6	14±0.00	18±1.41	15±2.83	13±1.41	4±2.12	4±0.71	17±1.41	26±1.41	17±2.12	13±2.12	4±2.12	2±1.41
KI-7	15±2.12	17±1.41	9±1.41	16±0.71	2±1.41	3±0.71	15±2.83	21±2.12	15±1.41	11±2.12	7±0.71	1±0.71
KI-8	14±2.12	14±1.41	10±2.83	10±1.41	4±0.71	3±1.41	12±2.83	21±1.41	17±0.00	13±0.71	9±0.71	3±2.12
KI-9	14±1.41	11±2.12	10±2.83	12±2.12	2±2.12	1±0.71	17±0.71	23±2.83	14±0.71	14±2.83	5±1.41	2±1.41
KI-10	12±0.71	21±0.71	15±2.12	12±1.41	5±1.41	2±1.41	13±3.54	26±2.83	16±0.71	11±0.00	4±2.12	3±1.41
Totales:												
X̄±D.E.	15±1.56	17±1.77	12±2.05	12±1.06	4±1.27	2±0.92	15±2.12	24±2.33	17±1.91	12±1.70	5±2.05	2±0.99
P=0.05	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Cultivo de linfocitos a 28 °C												
	Control b						B I					
	(X̄) Linfocitos por día±D.E.						(X̄) Linfocitos por día±D.E.					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
KI-1	22±0.71	33±0.71	42±2.12	33±2.83	26±0.00	11±1.41	66±1.41	69±3.54	76±2.12	63±2.12	58±1.41	44±2.12
KI-2	19±1.41	26±1.41	38±1.41	27±2.12	18±1.41	9±0.71	57±1.41	68±0.71	64±1.41	46±2.12	43±0.71	33±2.12
KI-3	19±0.71	30±2.12	37±0.71	22±0.71	13±2.12	7±1.41	56±1.41	61±2.12	65±1.41	55±2.83	52±2.83	34±1.41
KI-4	18±2.12	34±0.71	37±2.83	25±2.83	18±0.71	11±0.71	53±0.71	53±2.12	59±0.00	47±2.83	38±1.41	24±2.83
KI-5	15±1.41	27±1.41	42±2.83	33±2.83	17±1.41	6±2.12	59±0.71	61±1.41	61±0.71	56±0.71	45±3.54	44±1.41
KI-6	18±0.71	31±0.71	34±1.41	31±1.41	14±2.12	9±1.41	55±1.41	66±2.12	59±0.71	46±4.95	44±3.54	33±2.12
KI-7	14±0.00	29±0.71	38±1.41	31±2.12	10±1.41	7±0.71	59±2.83	53±1.41	63±1.41	52±1.41	41±2.83	34±0.00
KI-8	15±2.83	31±1.41	34±4.95	29±2.83	14±0.71	5±1.41	55±1.41	61±1.41	55±2.83	47±3.54	43±1.41	30±2.12
KI-9	14±2.83	31±0.71	36±0.71	27±1.41	12±0.00	3±0.71	52±2.12	56±1.41	65±2.83	56±0.71	51±0.71	33±0.71
KI-10	16±0.71	28±0.00	40±2.12	32±2.12	11±1.41	4±1.41	63±2.12	59±0.71	51±0.00	48±1.41	43±0.00	32±2.12
Totales:												
X̄±D.E.	17±1.34	30±0.99	38±2.05	29±2.12	15±1.13	7±1.20	57±1.56	60±1.70	62±1.34	51±2.26	46±1.84	34±1.70
P=0.05	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b

Tabla 9. Promedio del conteo de linfocitos por día de cultivo y desviación estándar del cultivo celular a 25 °C vs 28 °C en la tortuga pochitoque común *K. s. cruentatum*.

Cultivo de linfocitos a 25 °C												
	Control a						A I					
	(X̄) Linfocitos por día±D.E.						(X̄) Linfocitos por día±D.E.					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Ks-1	14±4.24	17±2.83	18±0.71	10±2.83	5±1.41	2±0.71	17±2.12	22±3.54	19±0.71	7±2.83	4±0.00	2±0.71
Ks-2	14±0.71	15±3.54	15±0.71	9±0.00	4±0.71	2±2.83	14±4.24	19±2.83	16±0.71	7±0.00	2±1.41	1±0.71
Ks-3	14±1.41	16±0.71	12±0.71	7±0.00	3±1.41	3±0.71	16±1.41	21±0.71	17±1.41	9±0.71	3±0.71	1±0.00
Ks-4	18±1.41	19±0.71	16±0.00	10±0.71	3±0.00	1±0.00	17±2.12	21±1.41	18±1.41	7±1.41	3±2.12	1±1.41
Ks-5	16±3.54	15±1.41	17±3.54	10±2.12	2±0.71	1±1.41	12±2.83	18±0.00	13±2.12	5±2.12	4±1.41	1±0.71
Ks-6	14±0.71	15±0.00	11±1.41	6±0.00	3±2.83	2±0.71	15±1.41	18±3.54	19±0.71	6±1.41	4±2.12	0±0.00
Ks-7	14±2.83	15±7.07	16±1.41	9±0.71	3±0.00	2±0.71	17±2.83	18±2.12	14±3.54	5±0.71	4±2.83	1±0.00
Ks-8	17±1.41	21±2.12	14±2.12	6±1.41	4±0.71	1±0.71	17±2.12	21±3.54	16±1.41	9±0.71	1±0.71	1±1.41
Ks-9	15±3.54	18±3.54	13±2.12	7±1.41	2±1.41	0±0.00	17±2.83	20±0.71	14±0.71	7±1.41	1±0.71	1±0.71
Ks-10	12±2.83	20±5.66	15±2.12	7±2.12	1±1.41	1±0.71	16±5.66	16±1.41	16±1.41	4±2.83	1±0.00	0±0.00
Totales:												
X̄±D.E.	15±2.26	17±2.76	14±1.48	8±1.13	3±0.83	1±0.85	16±2.76	19±1.98	16±1.41	6±1.41	2±1.20	1±0.57
P=0.05	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Cultivo de linfocitos a 28 °C												
	Control b						B I					
	(X̄) Linfocitos por día±D.E.						(X̄) Linfocitos por día±D.E.					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Ks-1	22±4.95	32±4.24	42±2.83	33±3.54	17±0.71	8±0.71	42±2.83	55±3.54	72±3.54	54±2.83	37±2.83	25±3.54
Ks-2	14±2.83	29±0.71	45±3.54	26±2.83	13±2.12	9±0.00	36±0.71	54±3.54	69±2.83	44±4.24	32±0.00	27±4.95
Ks-3	16±0.00	37±3.54	37±5.66	33±1.41	14±1.41	6±1.41	36±2.12	58±1.41	64±2.12	50±2.12	35±2.12	27±2.83
Ks-4	19±0.71	34±2.83	38±3.54	27±0.71	16±2.12	5±2.12	36±2.83	50±2.12	65±0.71	45±3.54	27±2.12	24±2.12
Ks-5	15±2.83	29±2.83	49±2.83	32±4.95	13±0.71	5±0.71	34±1.41	54±1.41	65±2.12	51±0.71	30±4.95	29±1.41
Ks-6	13±2.83	35±1.41	35±3.54	32±2.12	10±2.12	7±2.12	36±2.12	57±2.83	66±3.54	49±4.24	28±3.54	31±3.54
Ks-7	9±1.41	21±1.41	36±0.71	30±3.54	9±2.12	3±2.12	39±0.71	55±3.54	70±2.12	49±4.24	28±0.71	25±0.71
Ks-8	15±2.83	31±0.71	40±2.12	31±0.71	10±1.41	4±0.71	35±2.83	57±2.83	64±2.83	45±1.41	36±1.41	27±0.00
Ks-9	13±1.41	37±2.12	39±0.00	27±1.41	9±1.41	2±0.71	36±1.41	47±2.12	63±2.12	49±1.41	31±1.41	25±2.83
Ks-10	11±0.71	25±1.41	35±2.12	35±2.12	8±0.71	1±1.41	37±2.12	54±2.83	62±2.83	52±3.54	27±3.54	21±1.41
Totales:												
X̄±D.E.	15±2.05	31±2.12	39±2.69	30±2.33	12±1.48	5±1.20	36±1.91	54±2.62	66±2.47	49±2.83	31±2.26	26±2.33
P=0.05	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b

Tabla 10. Promedio del conteo de linfocitos por día de cultivo y desviación estándar del cultivo celular a 25 °C vs 28 °C en la tortuga pochitoque común *K. acutum*.

Cultivo de linfocitos a 25 °C												
	Control a						A I					
	(X̄) Linfocitos por día±D.E.						(X̄) Linfocitos por día±D.E.					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Ka-1	16±2.12	18±1.41	18±1.41	13±0.00	7±0.71	1±0.71	21±2.12	24±1.41	15±3.54	10±2.83	5±1.41	1±0.71
Ka-2	15±0.00	16±2.83	17±2.12	13±2.83	7±0.00	3±0.00	19±3.54	24±2.12	16±0.71	9±0.00	6±2.12	2±0.71
Ka-3	17±3.54	19±0.71	17±1.41	14±0.71	8±1.41	2±0.00	20±0.00	22±1.41	15±1.41	10±4.24	4±1.41	2±0.00
Ka-4	17±0.71	18±2.12	16±2.12	12±0.71	8±1.41	2±0.71	21±2.12	25±0.71	16±0.00	9±2.12	3±2.12	1±0.71
Ka-5	18±4.24	19±0.71	15±0.00	11±0.71	7±0.71	0±0.00	18±0.71	23±1.41	17±0.00	10±2.12	4±1.41	1±0.00
Ka-6	19±0.71	18±3.54	17±2.83	11±1.41	4±0.00	1±1.41	19±1.41	21±0.71	17±2.83	8±2.12	4±1.41	2±0.71
Ka-7	15±2.83	16±4.24	17±0.71	14±0.00	4±0.71	1±0.00	20±1.41	24±0.71	16±2.83	10±0.71	2±0.71	1±0.71
Ka-8	18±2.12	18±4.95	15±2.83	12±1.41	4±2.83	1±0.71	20±3.54	26±0.71	15±2.83	10±2.12	3±1.41	0±0.00
Ka-9	19±1.41	20±0.00	17±0.71	11±1.41	3±0.00	2±1.41	20±2.83	23±1.41	13±2.83	9±2.12	4±0.71	2±0.71
Ka-10	17±3.54	23±0.71	16±1.41	11±0.71	3±0.71	1±0.71	20±0.71	23±2.12	12±2.12	8±1.41	4±2.83	2±2.12
Totales:												
X̄±D.E.	17±2.12	18±2.12	16±0.93	12±0.99	5±0.85	1±0.57	20±1.84	23±1.27	15±1.91	9±1.98	4±1.56	1±0.64
P=0.05	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Cultivo de linfocitos a 28 °C												
	Control b						B I					
	(X̄) Linfocitos por día±D.E.						(X̄) Linfocitos por día±D.E.					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Ka-1	18±2.12	37±3.54	39±0.71	30±2.12	19±4.24	7±2.83	26±2.83	41±4.95	49±3.54	52±2.12	29±5.66	10±2.12
Ka-2	16±2.83	32±2.83	33±2.83	28±2.83	19±2.12	7±0.00	31±0.71	40±0.71	48±3.54	46±1.41	32±7.78	10±0.71
Ka-3	18±2.12	30±1.41	30±8.49	24±4.24	19±2.83	9±0.71	35±2.12	43±4.24	47±0.00	48±2.12	27±6.36	15±0.71
Ka-4	14±1.41	27±2.83	32±0.71	29±2.12	19±0.71	4±1.41	30±1.41	42±3.54	47±3.54	42±2.83	27±3.54	13±0.71
Ka-5	14±2.12	28±0.71	30±0.71	29±0.71	21±0.71	7±0.71	32±2.12	39±2.83	47±2.12	42±4.95	30±2.12	14±0.71
Ka-6	16±2.83	28±2.12	34±4.24	28±2.83	17±1.41	8±2.12	27±0.00	39±0.71	47±5.66	45±4.95	22±1.41	11±2.12
Ka-7	17±2.83	29±2.83	30±0.00	25±0.00	15±1.41	6±0.71	27±4.24	39±0.00	47±3.54	45±1.41	22±2.83	9±1.41
Ka-8	18±1.41	30±0.00	31±2.12	25±3.54	16±2.12	5±0.71	31±2.12	44±0.71	49±0.71	42±2.12	27±2.12	13±2.83
Ka-9	17±2.12	27±1.41	28±4.24	25±2.12	18±2.12	3±1.41	31±2.83	46±1.41	48±3.54	40±1.41	26±0.00	14±1.41
Ka-10	15±2.12	26±2.83	27±1.41	26±0.71	18±4.95	2±1.41	28±0.00	45±2.12	49±2.83	43±4.24	22±2.12	15±3.54
Totales:												
X̄±D.E.	16±2.19	29±2.05	31±2.55	27±2.12	18±2.26	6±1.20	30±1.84	42±2.12	47±2.90	44±2.76	26±3.39	12±1.63
P=0.05	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b

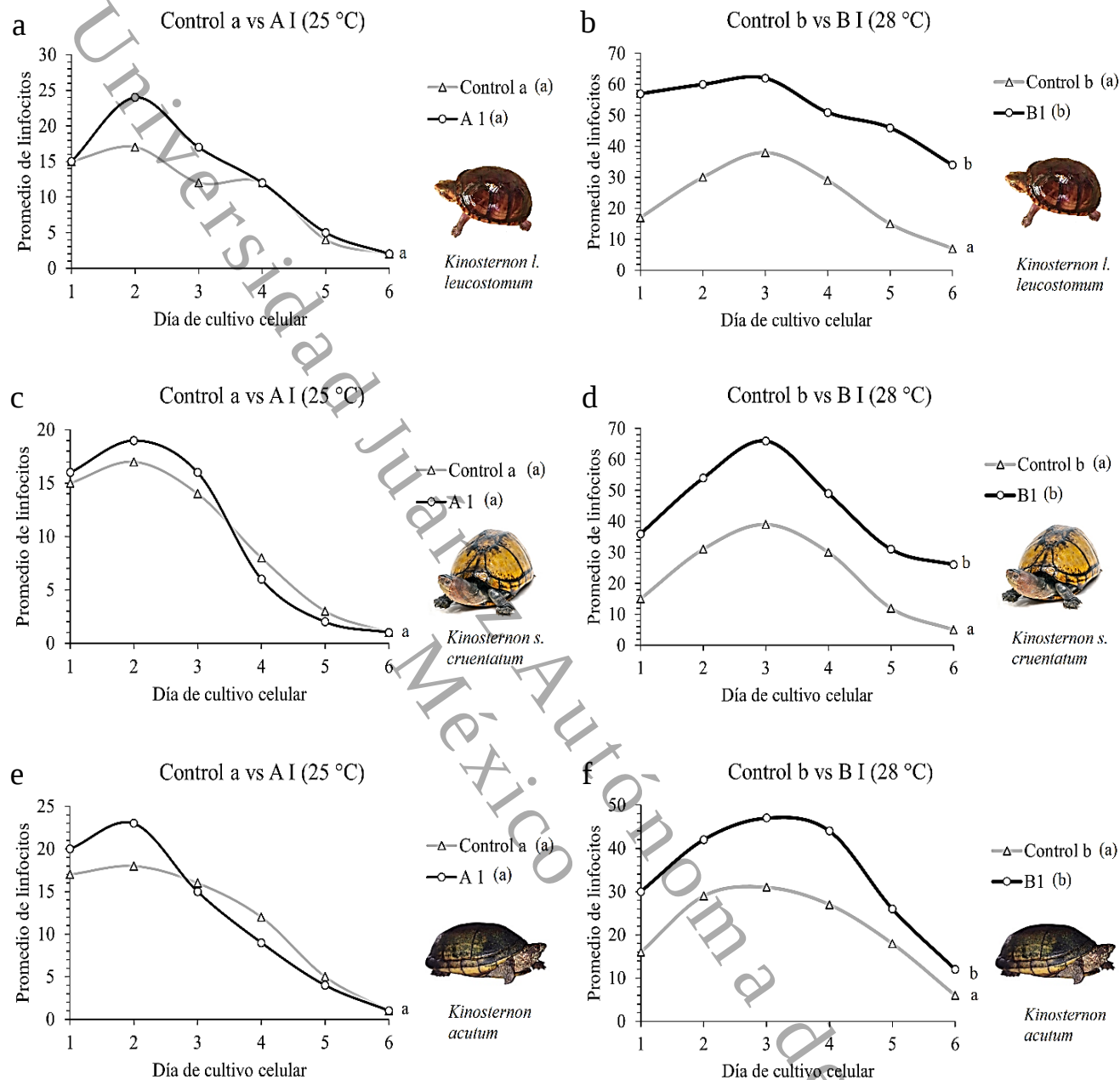


Figura 16. Comparación experimental de cultivo *in vitro* a temperatura 25 °C vs 28 °C en las tortugas dulceacuícolas *K. l. leucostomum* (a, b), *K. s. cruentatum* (c, d) y *K. acutum* (e, f). Literales iguales en cada gráfico, representa que no hay diferencias significativas a $P \leq 0.05$ y en caso contrario las diferencias existen.

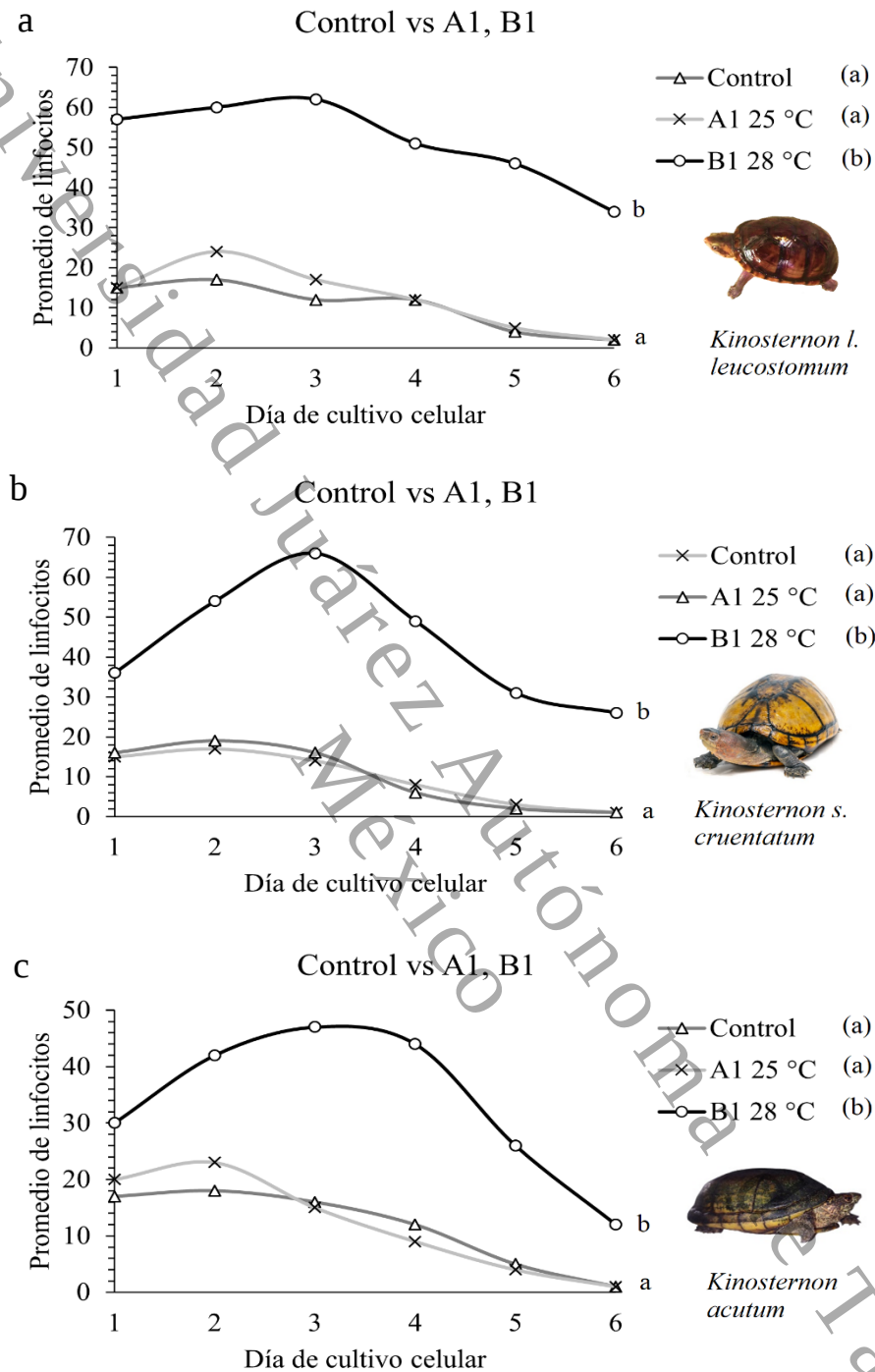


Figura 17. Comparación del cultivo celular *in vitro* de linfocitos: Control vs Temperaturas A1 “25 °C” y B1 “28 °C” en las tortugas dulceacuícolas *K. l. leucostomum* (a), *K. s. cruentatum* (b) y *K. acutum* (c). Literales iguales en cada gráfico, representa que no hay diferencias significativas a $P \leq 0.05$ y en caso contrario las diferencias existen.

4.4. DISCUSIÓN

La técnica empleada para la extracción sanguínea en las tres especies pochitoques resultó exitosa, ya que se lograron obtener 31200 linfocitos. La especie en la que se obtuvo mayor número de linfocitos fue el pochitoque común *K. l. leucostomum* con 11621 linfocitos, seguido del pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* con 10205 linfocitos y el pochitoque jahuactero *K. acutum* con 9374 linfocitos. Esta variación en el conteo de células linfocitarias en las tres especies de tortugas dulceacuícolas puede deberse a varios factores, como los caracteres fisiológicos en las tres especies, la manipulación previa a la extracción de la muestra sanguínea y factores ambientales, los cuales se detallan enseguida:

1) Caracteres fisiológicos: La movilidad y fuerza de las extremidades, tamaño del plastrón y del carapacho, tamaño de la cola y el tamaño de la vena coccígea pueden influir en el conteo de linfocitos, por ejemplo, en las hembras de los kinosternidos la longitud de la cola es reducida (Iverson & Vogt, 2011; Silva-da-Silva et al., 2021), por lo que la vena coccígea también es pequeña en comparación de los machos (Jenkins-Perez, 2012), además, el tamaño reducido de la cola con relación a la capacidad de movilidad del plastrón en los kinosternidos y a la carencia de herramientas o dispositivos que ayuden a sujetar la cola, también dificulta la toma de muestra (Rohilla & Tiwari, 2008). Por otra parte, la fuerza en sus patas anteriores dificulta la toma de muestra sanguínea (Ulsh et al., 2001), los repetidos impulsos provocan que el tiempo de la extracción de la sangre se reduzca a segundos y en consecuencia la cantidad de la muestra sea insuficiente, así también debido a que el sitio de punción es muy cercano a los vasos linfáticos y en combinación con lo anterior, se aumenta el riesgo de hemodilución (Rodríguez-Almonacid et al., 2022). Por ello, algunos autores han señalado que en especies de tortugas dulceacuícolas (que por lo regular corresponden a especies pequeñas), la extracción de sangre por vena coccígea resulta con mucha dificultad (Rohilla & Tiwari, 2008). Sin embargo, otros autores han recomendado trabajar con la vena coccígea porque facilita la toma de muestra en comparación de otras zonas de punción como la vena yugular y la vena cardiaca, donde las tortugas suelen defenderse con mordidas que pueden llegar amputar dedos o partes de la piel para quien los manipule (Johnson & Nielsen, 2016), por tal motivo, al trabajar en esta zona, se debe llevar a cabo la aplicación de sedantes (Mans,

2008), lo que convierte la técnica en un proceso invasivo (Haskell & Pokras, 1994; Ulsh et al., 2001).

Otro factor a considerar es el sexo de los organismos estudiados, ya que se ha reportado que los niveles de linfocitos pueden variar significativamente más altos en las hembras que en los machos (Dickinson et al., 2002).

2) Manipulación de los especímenes: Se ha documentado que la manipulación incorrecta de las tortugas, así como su mantenimiento en cautiverio fomenta el estrés en los organismos, lo cual provoca disminución en los conteos de células linfocitarias, ya que causa desequilibrio en los componentes del sistema inmunológico, aumentando las hormonas suprarrenales (Caliani et al., 2019). Además, un inadecuado sistema de nutrición o la malnutrición crónica, también es una causa en la disminución del conteo de linfocitos (Martínez-Silvestre et al., 2011).

3) Factores ambientales: También fomentan el estrés citológico en las tortugas, ya que dicho estrés provoca que algunas hormonas como los glucocorticoides aumenten descontroladamente, lo que causa que las células como los linfocitos se adhieran a las paredes de los vasos sanguíneos y migren a otros tejidos como el bazo, médula ósea, piel, entre otros, dando como resultado que disminuyan los linfocitos circundantes, de tal modo que los análisis y perfiles hematológicos, así como en los citoquímicos se vean alterados, generando información poco fiable en los estudios. (Caliani et al., 2019). Además, otros autores han señalado que los niveles de linfocitos pueden variar de acuerdo a las diferencias estacionales y anuales relacionados con las precipitaciones, los cuales bajan las temperaturas y suprimen o inhiben la respuesta inmune de los organismos; mientras que la disponibilidad de forraje y la condición fisiológica de los organismos también puede influir en los niveles de linfocitos (Dickinson et al., 2002; Martínez-Silvestre et al., 2011).

Sin dudas, las diferentes técnicas que existen para la extracción de muestra sanguínea en tortugas dulceacuícolas tienen ventajas y desventajas (Rodríguez-Almonacid et al., 2022). Sin embargo, en el presente estudio se considera exitoso por la cantidad de linfocitos observados y analizados, ya que la finalidad de esta investigación no está enfocada al perfil hematológico, sino a la productividad de células linfocitarias implementando un diseño experimental. En este contexto, aunque se determinó variación en el conteo de linfocitos en

las tres especies de pochitoques *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum*, para este estudio se determinó como una condición normal por los caracteres fisiológicos-morfológicos, relacionados con la técnica de extracción de muestra sanguínea en las tres especies de tortugas. Esto no influyó en los resultados y su interpretación estadística.

Por otra parte, el pico de reproducción de linfocitos más alto ocurrió al tercer día del cultivo, es decir, a 72 h de iniciar el cultivo celular, condición que fue observado en las tres especies de tortugas dulceacuícolas *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum* del presente estudio. Este resultado concuerda con el reporte de Rohilla et al. (2006), donde implementaron el tiempo de cultivo celular a 72 h (tiempo óptimo) en las especies de tortugas dulceacuícolas *Lissemys punctata* y *Geoclemys hamiltoni* de Uttar Pradesh, en India; al igual que en el reciente estudio de Hong et al. (2023) en la tortuga gigante de caparazón blando asiática *Pelochelys cantorii* de Guangzhou, China; incluso, en la tortuga marina verde *Chelonia mydas* de Florida, en Estados Unidos de América, se ha recomendado implementar el tiempo de cultivo a 72 h con organismos sanos y enfermos (Cray et al., 2001). Además, el resultado encontrado en este trabajo de las tortugas pochitoques del estado de Tabasco es similar a la recomendación de Silva et al. (2011), donde señalan que el período de incubación óptimo para la reproducción celular es de 70 h, demostrado en la tortuga *Chelonoidis carbonaria* de São Paulo, Brasil.

Estos resultados difieren con el estudio comparativo de cultivo celular de sangre periférica en la tortuga dulceacuícola de orejas rojas *Trachemys scripta* de Ulsh et al. (2001), donde determinaron el tiempo óptimo de cultivo, encontrando que de 48 a 60 h la cantidad de células era prácticamente nula, mientras que a partir de 72 y hasta 80 h no hubo diferencias con respecto al rango anterior (48-60 h), pero aumentó drásticamente la producción de células a partir de 84 h y hasta 96 h. En otras especies de tortugas, especialmente en las marinas como la tortuga cabezona *Caretta caretta*, también se han establecido protocolos donde el cultivo de linfocitos debe realizarse por 95.5 h (aproximadamente 4 días) con especímenes de Santa Marta, Colombia (López et al., 2008), y otros reportes incluso incrementan drásticamente el tiempo de cultivo de los linfocitos a 136 h, como es el caso de la tortuga *C. caretta* colectadas en Carolina del Norte, en Estados Unidos de América (Keller et al., 2006).

En cuanto a la temperatura óptima de cultivo, las tres especies del presente estudio *K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum* presentaron mayor número de linfocitos a 28 °C con diferencias significativas ($p=0.05$) con respecto a la temperatura de 25 °C realizado en este experimento, y al igual que en el tiempo óptimo de cultivo, este trabajo concuerda con Rohilla et al. (2006), donde implementa la temperatura óptima de cultivo de linfocitos a 28 °C en las tortugas *L. punctata* y *G. hamiltoni*, así como con el estudio de Hong et al. (2023) en la tortuga gigante de caparazón blando *P. cantorii* (con 28 °C) y en el reporte de Liu et al. (2022) sobre la tortuga galápagos amarilla asiática *Mauremys mutica* (con 28 °C). Además, es comparable con el estudio de Ulsh et al. (2001) en la tortuga dulceacuícola de orejas rojas *T. scripta*, donde establece la temperatura de 29 °C para el cultivo celular.

Por otra parte, los resultados en este trabajo difieren y contrastan con el estudio de Keller et al. (2005) en la tortuga *C. mydas*, implementando una temperatura de 30 °C en su cultivo de linfocitos. De igual manera, se difiere con el trabajo de López et al. (2008) en la tortuga *C. caretta*, donde establecieron en su protocolo de cultivo de linfocitos una temperatura de 32 °C. Otros autores como Cray et al. (2001) realizaron y recomendaron la elaboración del cultivo celular a 37 °C en la tortuga *C. mydas*, al igual que en Silva et al. (2011) en la tortuga *C. carbonaria*.

De acuerdo a lo anterior, es evidente que en las tortugas existe variación en las técnicas y protocolos para el cultivo *in vitro* de linfocitos; tal situación se manifiesta en especies de tortugas dulceacuícolas como en tortugas marinas. En el caso especial de las tortugas dulceacuícolas, al cual pertenecen las tres especies estudiadas en este trabajo, tuvieron un comportamiento o ritmo de producción celular idéntico, lo cual puede estar asociado a las temperaturas preferenciales de dichas especies, como lo señala Ulsh et al. (2001), y lo cual está respaldado por diversos reportes de temperatura preferencial de tortugas en zonas tropicales, donde la temperatura presenta variaciones entre 25 y 30 °C, dependiendo de la zona geográfica, como es el caso de *E. macquarii krefftii* con 25 °C (Kidman et al., 2023), *P. megacephalum* con 28 °C (Shen et al., 2013), otras especies como *T. scripta* con 29 °C (Ulsh et al., 2001) y *A. spinifera* con 30 °C (Tamplin et al., 2020), razón por la cual, en las tortugas existen protocolos de cultivo *in vitro* de linfocitos tan variados, por lo que es importante elaborar experimentos como el del presente estudio para las diferentes especies de tortugas.

En conclusión, la evidencia mostrada en esta investigación usando como modelo biológico a las tres especies de kinosternidos (*K. l. leucostomum*, *K. s. cruentatum* y *K. acutum*) que habitan en el estado de Tabasco, demostró que la temperatura óptima para el cultivo *in vitro* de linfocitos es de 28 °C ($P=0.05$), alcanzando su mayor tasa de productividad celular a 72 h. En este estudio se descarta el uso de temperatura de 25 °C para el cultivo de linfocitos de posteriores investigaciones y se recomienda que el tiempo del cultivo no exceda 80 h, ya que es cuando la fase estacionaria inicia su proceso de decrecimiento en la reproducción celular. Es importante continuar con estudios de cultivo *in vitro* de células linfocitarias en las tortugas dulceacuícolas en el estado de Tabasco y otros estados en el país, ya que la naturaleza poiquilotérmica de estos reptiles y los distintos climas que prevalecen en la extensión del territorio mexicano genera temperaturas preferenciales diferentes, por lo que estudios experimentales como el presente documento ayudaría a comprender y elaborar protocolos específicos para especies o familias de tortugas que habitan en nuestro país.

4.5. REFERENCIAS

- Abercrombie, M. 1961. Ross Granville Harrison 1870-1959. Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society. 7: 110-126.
- Bhagat, S. & Singh, S. 2022. Cultivating human tissues and organs over lab-on-a-chip models: Recent progress and applications. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 187(1): 205-240.
- Bianchi, P. & van Wijk, R. 2021. New methods for red blood cell research and diagnosis. Frontiers in Physiology. 12: 755664.
- Caliani, I., Poggioni, L., D'Agostino, A., Fossi, M.C. & Casini, S. 2019. An immune response-based approach to evaluate physiological stress in rehabilitating loggerhead sea turtle. Veterinary Immunology and Immunopathology. 207: 18-24.
- Claessen, M.J.A.G., Yagci, N., Fu, K., Brandsma, E., Kersten, M.J., von Lindern, M. & van den Akker, E. 2024. Production and stability of cultured red blood cells depends on the concentration of cholesterol in culture medium. Scientific Reports. 14: 15592.
- Clark, H.F. 1973. Reptiles. In: Kruse, P.F. & Patterson, M.K. (eds.). Chapter 25. Tissue culture, methods and applications. Academic Press. Pp. 147-150.

- Connor, K., Fannin, M., Kent, J. & Toye, A. 2021. Blood culture: reimag(in)ing life at a cellular scale. *Interdisciplinary Science Reviews*. 46(4): 655-676.
- Cray, C., Varella, R., Bossart, G.D. & Lutz, P. 2001. Altered *in vitro* immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 32(4): 436-440.
- Dickinson, V.M., Jarchow, J.L. & Trueblood, M.H. 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*. 38(1): 143-153.
- Dubey, A.K., Lavanya, L., Sadananda, D., Gouthami, K., Elfansu, K., Singh, A. & Singh A.K. 2021. Inferences of carbon dioxide in present-day cell culture systems: An unacknowledged problem and perspectives. *Austin Therapeutics*. 6(1): 1033.
- Dunnett, C.W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*. 50(272): 1096-1121.
- Dunnett, C.W. 1964. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*. 20(3): 482-491.
- Euler, M., Perl, T., Eickel, I., Dudakova, A., Rosado, E.M., Drees, C., Vautz, W., Wieditz, J., Meissner, K. & Kunze-Szikszay. 2022. Blood culture headspace gas analysis enables early detection of *Escherichia coli* bacteremia in an animal model of sepsis. *Antibiotics*. 11(8): 992.
- Fujiwara, A., Nishida-Umehara, C., Sakamoto, T., Okamoto, N., Nakayama, I. & Abe, S. 2001. Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica*. 111: 77-89.
- Gallego-Murillo, J.S., Iacono, G., van der Wielen, L.A.M., van den Akker, E., von Lindern, M. & Wahl, S.A. 2022. Expansion and differentiation of *ex vivo* cultured erythroblasts in scalable stirred bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 119(11): 3096-3116.
- Golkar-Narenji, A., Dziegiel, P., Kempisty, B., Petite, J. & Mozdziak, P.E. 2023. *In vitro* culture of reptile PGCS to preserve endangered species. *Cell Biology International*. 47(8): 1314-1326.
- Harrison, R.G. 1906. Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 4(1): 140-143.

- Haskell, A. & Pokras, M.A. 1994. Nonlethal blood and muscle tissue collection from redbelly turtles for genetic studies. *Herpetological Review*. 25(1): 11-12.
- Hong, X., Liu, H., Wang, Y., Li, M., Ji, L., Wang, K., Wei, C., Li, W., Chen, C., Yu, L., Zhu, X. & Liu, X. 2023. A chromosome-level genome assembly of the Asian giant softshell turtle *Pelochelys cantorii*. *Scientific Data*. 10: 754.
- Iverson, J.B. & Vogt, R.C. 2011. *Kinosternon acutum* Gray 1831 – Tabasco mud turtle, montera, chechagua de monte. In: Rhodin, A.G.J., Pritchard, P.C.H., van Dijk, P.P., Saumure, R.A., Buhlmann, K.A., Iverson, J.B., & Mittermeier, R.A. (Eds.). *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. Chelonian Research Monographs. 5: 62.
- Jedrzejczak-Silicka, M. 2017. History of cell culture. In: Gowder, S.J.T. (ed.). *New insights into cell culture technology*. Intech Open. Pp: 66905.
- Jenkins-Perez, J. 2012. Hematologic evaluation of reptiles: A diagnostic mainstay. *Veterinary Technician*. 33(8): 1-8.
- Johnson, R.D. & Nielsen, C.L. 2016. Traumatic amputation of finger from an alligator snapping turtle bite. *Wilderness & Environmental Medicine*. 27(2): 277-281.
- Jolly, J. 1903. Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors l'organisme. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*. 55: 1266-1268.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P.D., Kucklick, J.R., Keil, D.E. & Peden-Adams, M.M. 2006. Effects of Organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: Comparison of correlative field study and *in vitro* exposure experiments. *Environmental Health Perspectives*. 114(1): 70-76.
- Kidman, R.A., McKnight, D.T., Schwarzkopf, L. & Nordberg, E.J. 2023. Too cold is better than too hot: Preferred temperatures and basking behaviour in a tropical freshwater turtle. *Austral Ecology*. 48(8): 1532-1546.
- Kweon, S., Kim, S. & Baek, E.J. 2023. Current status of red blood cell manufacturing in 3D culture and bioreactors. *Blood Research*. 58(S1): 46-51.
- Legler, J., & Vogt, R.C. (2013). *The turtles of Mexico: Land and freshwater forms*. (1st Edition). Berkeley: University of California Press.

- Liu, X., Liu, F., Xu, H., Yang, Y., Wang, Y., Hong, X., Li, W., Yu, L., Chen, C., Xu, H. & Zhu, X. 2022. Characterization of the *in vitro* cultured ovarian cells in the Asian yellow pond turtle (*Mauremys mutica*). *Biology*. 11(10): 1404.
- López, E.A., Hernández-Fernández, J. & Bernal-Villegas, J. 2008. Condiciones óptimas de cultivo de linfocitos y análisis parcial del cariotipo de la tortuga cabeza, *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) en Santa Marta, Caribe Colombiano. *Revista de Biología Tropical*. 56(3): 1459-1469.
- Majtánová, Z., Symonová, R., Arias-Rodriguez, L., Sallan, L. & Ráb, P. 2017. “Holostei versus Halecostomi” Problem: Insight from cytogenetics of ancient nonteleost actinopterygian fish, bowfin *Amia calva*. *Journal of Experimental Zoology*. 620-628.
- Mani, S. 2023. Properties of cultured cells and selection of culture media. In: Mani, S., Singh, M. & Kumar, A. *Animal cell culture: Principles and practice*. Chapter 6. Switzerland, AG. 89-97.
- Mans, C. 2008. Venipuncture techniques in chelonian species. *Lab Animal*. 37(7): 303-304.
- Martínez-Silvestre, A., Lavín, S. & Cuenca, R. 2011. Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*. 31(3): 131-141.
- Perpiñán, D., Hernandez-Divers, S.M., McBride, M., Hernandez-Divers, S.J. 2006. Comparison of three different techniques to produce blood smears from green iguanas, *Iguana iguana*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 16(3): 99-101.
- Prakash, G. & Srivastava, A.K. 2008. Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. *Biochemical Engineering Journal*. 40(2): 218-226.
- Reese, K.L., Rasley, A., Avila, J.R., Jones, A.D. & Frank, M. 2020. Metabolic profiling of volatile organic compounds (VOCs) emitted by the pathogens *Francisella tularensis* and *Bacillus anthracis* in liquid culture. *Scientific Reports*. 10: 9333.
- Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., Bour, R., Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H.B., & van Dijk, P.P. (2021). *Turtles of the world. Annotated checklist and Atlas of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status*. Chelonian Research Monographs. 8: 1-472.

- Rodríguez-Almonacid, C.C., Vargas-León, C.M., Moreno-Torres, C.A. & Matta, N.E. 2022. Consideraciones para la obtención de sangre en tortugas: sitios de venopunción y anticoagulantes. *Revista MVZ Córdoba*. 27(2): e2256.
- Rohilla, M.S. & Tiwari, P.K. 2008. Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic study. *Acta Herpetologica*. 3(1): 65-69.
- Rohilla, M.S., Rao, R.J. & Tiwari, P.K. 2006. Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*. *Current Science*. 90(8): 1130-1134.
- SEMARNAT. 2019. Modificación del anexo normativo III, lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación "DOF". En línea: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019#gsc.tab=0
- Shen, J., Meng, F., Zhang, Y. & Du, W. 2013. Field body temperature and thermal preference of the big-headed turtle *Platysternon megacephalum*. *Current Zoology*. 59(5): 626-632.
- Silva, T.L., Silva, M.I.A., Venancio, L.P.R., Zago, C.E.S, Moscheta, V.A.G., Lima, A.V.B., Vizotto, L.D., Santos, J.R., Bonini-Domingos, C.R., Azeredo-Oliveira, M.T.V. 2011. Simple method for culture of peripheral blood lymphocytes of Testudinidae. *Genetics and Molecular Research*. 10(4): 3020-3025.
- Silva-da Silva, J., dos Santos-Braga, B.S., da Silva-Costa, J., Schlemmer-Brasil, L., Lobato de Oliveira-Bahia, V.R., Pimentel-Leal, R., Felipe-Marques, J.R. & de Araújo-Guarães, D.A. 2021. Sexual dimorphism in the turtle *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) from Marajó Island, Brazilian Amazon. *Revista de Biología Tropical*. 69(2): 601-614.
- Tamplin, J.W., Anderson, K.J., Turcotte, E.A. & Myers, M.C. 2020. Effect of acclimation temperature and substrate type on selected temperature, movement and activity of juvenile spiny softshell turtles (*Apalone spinifera*) in a aquatic thermal gradient. *Journal of Thermal Biology*. 93: 102701.

- Ulsh, B.A., Congdon, J.D., Hinton, T.G., Whicker, F.W. & Bedford, J.S. 2001. Culture methods for turtle lymphocytes. *Methods in Cell Science*. 22: 285-297.
- Yang, Y. & Balcarcel, R.R. 2024. Determination of carbon dioxide production rates for mammalian cells in 24-well plates. *BioTechniques*. 36: 286-295.
- Yang, Z. & Xiong, H.R. 2012. Culture conditions and types of growth media for mammalian cells. *InTech*. 2012: 52301.

ANEXO IV

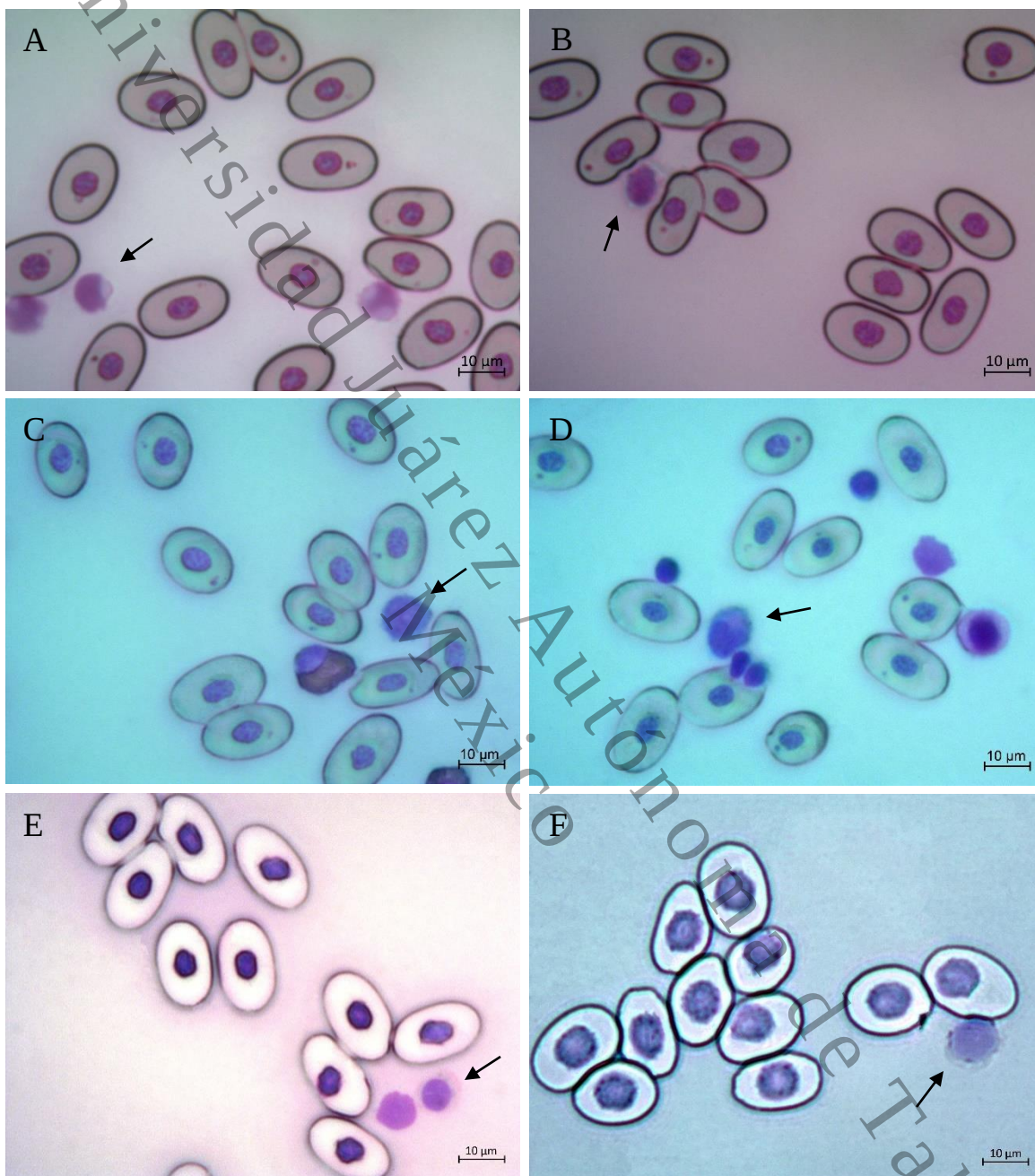


Lámina IV. Linfocitos (flechas) de las tortugas dulceacuícolas *K. l. leucostomum* (A, B), *K. a. acutum* (C, D) y *K. s. cruentatum* (E, F).

CAPÍTULO V

COMPOSICIÓN CARIOTÍPICA DE TRES KINOSTERNIDOS DEL SURESTE DE MÉXICO, *K. leucostomum leucostomum*, *K. acutum* Y *K. scorpioides cruentatum* (TESTUDINES: KINOSTERNIDAE)

Javier Hernández-Guzmán & Lenin Arias-Rodríguez

Resumen: En el estado de Tabasco, sureste de México, habitan tres especies del género *Kinosternon*, el pochitoque común *K. leucostomum leucostomum*, el pochitoque jahuactero *K. acutum* y el pochitoque *K. scorpioides cruentatum*. Los antecedentes en las tortugas dulceacuícolas de la familia Kinosternidae han demostrado variedad cromosómica y cariotípica entre las especies. El objetivo fue describir la estructura cromosómica en mitosis de las hembras y machos de las tortugas *K. l. leucostomum*, *K. acutum* y *K. s. cruentatum*. Se determinó que el número modal diploide fue $2n=56$ cromosomas en las tres especies de pochitoques. Se identificó variación cariotípica en: *K. l. leucostomum* con 17 pares metacéntrico-submetacéntrico “msm” + 11 pares telocéntrico “T” (NF= 90), mientras que las especies *K. acutum* y *K. s. cruentatum* con 28 pares “msm” (NF= 112). El pochitoque *K. l. leucostomum*, fue la única especie donde se pudo observar cromosomas supernumerarios, desde 2 hasta 5 microcromosomas. En los cariotipos de las tres especies no fue posible identificar la presencia de cromosomas heteromórficos. Se reveló la morfología, morfometría y el cariotipo inédito de *K. acutum*, y la comparación cariotípica de *K. l. leucostomum* y *K. s. cruentatum* con otros estudios ratificó la variación citogenética entre poblaciones.

Palabras clave: Cariotipo, cromosomas, kinosternidos, microcromosomas, tortugas.

¹División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa- Cárdenas Km. 0.5, CP. 86150, Villahermosa, Tabasco, México.

Enviado a: Ecología Aplicada

Nombre de la Editorial: Universidad Nacional Agraria La Molina

Fecha de envío programada: 16 de enero de 2026

5.0. COMPOSICIÓN CARIOTÍPICA DE TRES KINOSTERNIDOS DEL SURESTE DE MÉXICO, *K. leucostomum leucostomum*, *K. acutum* Y *K. scorpioides cruentatum* (TESTUDINES: KINOSTERNIDAE)

Abstract: In the state of Tabasco, southeastern Mexico, three species of the genus *Kinosternon* are found: the common freshwater turtle (*K. leucostomum leucostomum*), the Mexican freshwater turtle (*K. acutum*), and the scorpionfish turtle (*K. scorpioides cruentatum*). Previous studies of freshwater turtles of the Kinosternidae family have demonstrated chromosomal and karyotypic diversity among species. In Tabasco, cytogenetic studies of turtles are scarce, and some species still lack chromosomal and karyotypic information. Therefore, the objective of this study was to describe in detail the mitotic chromosomal structure of female and male turtles *K. l. leucostomum*, *K. acutum*, and *K. s. cruentatum*. The diploid modal number was determined to be $2n = 56$ chromosomes in all three freshwater turtle species. Karyotypic variation was identified according to the following chromosomal formulas: *K. l. leucostomum* with 17 metacentric-submetacentric “msm” pairs + 11 telocentric “T” pairs (NF = 90), while the species *K. acutum* and *K. s. cruentatum* had 28 “msm” pairs (NF = 112). The common pochitoque, *K. l. leucostomum*, was the only species in which supernumerary chromosomes or “B” microchromosomes could be identified, ranging from 2 to 5 microchromosomes. The presence of heteromorphic chromosomes could not be identified in the karyotypes of the three species. The morphology, morphometry, and previously unpublished karyotype of *K. acutum* were revealed, and the karyotypic comparison of *K. l. leucostomum* and *K. s. cruentatum* with other studies confirmed the cytogenetic variation among populations.

Keywords: Karyotype, chromosomes, kinosternids, microchromosomes, turtles.

5.1. INTRODUCCIÓN

La citogenética es una técnica que se emplea para el estudio de todos los caracteres morfológicos de los cromosomas que posee un organismo (Balajee & Hande, 2018). Si bien, es una técnica considerada para el estudio de la biología básica en las especies, también es útil para descubrir información genética inédita en las especies, incluso en la actualidad con todos los avances y opciones que se ofrecen en su metodología (Balajee & Hande, 2018; Kang, 2018).

A diferencia de otros grupos taxonómicos, en los Testudines, el cual es el Orden en el que se ubican todas las especies de tortugas, la composición cariotípica está conformada por diferentes tipos de cromosomas (Rovatsos et al., 2017; Mezzasalma et al., 2024), desde aquellos que son considerados como cromosomas grandes o largos, cromosomas medianos y cromosomas muy pequeños (Waters et al., 2021; Viana et al., 2022).

En la historia citogenética de las tortugas, estos cromosomas que son muy pequeños resultaron problemáticos cuando se trataba de clasificarlos con nomenclatura clásica de Levan et al. (1964), ya que su diminuto tamaño dificultaba diferenciar la composición morfológica de dichos cromosomas, es decir, los brazos p y q no se diferenciaban con relación al centrómero, por ello, en la publicación de Bickham (1975) considerando esta problemática en los cromosomas pequeños, estableció una nomenclatura nueva de clasificación cromosómica en su época, especialmente para tortugas y basándose en los parámetros propuestos por Levan et al. (1964). Esta nueva nomenclatura, clasificaba a los cromosomas en tres grupos principales: los cromosomas tipo A, los cromosomas tipo B y los cromosomas tipo C ó también llamados microcromosomas, los cuales eran todos aquellos microcromosomas que no podían ser medidos (Bickham, 1975).

Con el tiempo y el desarrollo de nuevas tecnologías en microscopía, fotomicroscopía, así como el desarrollo de programas bioinformáticos (Chadarevian, 2015; Kirov et al., 2017; Agbleke et al., 2021; Liehr, 2021), estos microcromosomas o cromosomas tipo C, al fin pueden ser correctamente identificados con la nomenclatura clásica de Levan et al. (1964), la cual se considera como la más completa e importante en el campo de la citogenética. En este contexto, la gran mayoría de los estudios cromosómicos y cariotípicos en las tortugas dulceacuícolas datan de hace más de 60 años (Deakin & Ezaz, 2019), por lo que es necesario

una revisión minuciosa de los cromosomas, en lo particular, de aquellos complementos cromosómicos considerados como microcromosomas de acuerdo con Bickham (1975).

Sumado a ello, los estudios de citogenética en tortugas mexicanas son muy escasos, especialmente en el estado de Tabasco, al sureste de México, dónde sólo se han estudiado algunas poblaciones en *K. l. leucostomum*, *Staurotypus triporcatus* (ambos de la familia Kinosternidae) y *T. v. venusta* (de la familia Emydidae) (Hernández-Guzmán, 2018; Hernández-Guzmán & Arias-Rodriguez, 2019). Con todos los estudios cariotípicos históricos existentes en la familia Kinosternidae, desde los estudios de Barros et al. (1972), Killebrew (1975), Sites et al. (1979), entre otros, aún existen especies con nula información citogenética, uno de ellos es el pochitoque jahuactero *K. acutum* donde no hay ningún antecedente de análisis cromosómico y cariotípico, posiblemente, a que su distribución es más restringida que las otras especies de pochitoque *K. l. leucostomum* y *K. s. cruentatum* de acuerdo con los mapas de distribución de Rhodin et al. (2021). Además, los estudios genéticos más recientes en kinosternidos ha permitido develar especies crípticas, especialmente en *Kinosternon scorpioides*, donde posiblemente, más de una especie pudiera estar coexistiendo con kinosternidos; lo anterior a llevado a formular que como consecuencia se reajuste la taxonomía en este grupo en particular (Hurtado-Gómez et al., 2024).

Además, los estudios cariotípicos en poblaciones del pochitoque común *K. l. leucostomum* de Tabasco, en el sureste mexicano, por Hernández-Guzmán et al. (2014, 2015) revelaron la presencia de variación morfométrica de cromosomas entre poblaciones, lo que podría estar ocurriendo en otras poblaciones de pochitoques por causas diversas, desde contaminación de los cuerpos acuáticos de Villahermosa y sus alrededores (Osorio-Pérez et al., 2024), hasta posibles zonas de hibridación que han dado origen a las anomalías cariotípicas en especies de vertebrados de esta región (Hernández-Guzmán & Arias-Rodriguez, 2024).

Por ello, la presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de describir caracteres citogenéticos, desde el número modal diploide $2n$ en células linfocitarias, hasta la morfología, morfometría, número fundamental y clasificación de los cromosomas, así como la posible identificación de citotipos particulares y atípicos como la presencia de microcromosomas “B” y cromosomas heteromórficos en las tres especies de *Kinosternon* que se distribuyen en el estado de Tabasco en México, el pochitoque común *K. l. leucostomum*, el pochitoque jahuactero *K. acutum* y el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum*.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Área de estudio y recolecta

Se recolectaron 35 individuos de tortugas pochitoques por observación visual en ambiente silvestre: el pochitoque común *K. l. leucostomum* (15: siete hembras y ocho machos), el pochitoque jahuactero *K. acutum* (10: seis hembras y cuatro machos) y el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* (10: siete hembras y tres machos). Las tortugas fueron observadas y recolectadas manualmente de las lagunas del Pueblo y Huapacal de la Villa Luis Gil Pérez, así como el área conservada de tintal de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco “UJAT” en el municipio del Centro, de los márgenes de los pantanos de la Villa Sánchez Magallanes, municipio de Cárdenas, y de las lagunas tres lomos en los pantanos del municipio de Centla, todas las localidades del estado de Tabasco, México. Los individuos recolectados, se mantienen vivos y en condiciones óptimas de mantenimiento, calidad de agua y alimentación en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la UJAT. La identificación taxonómica, se basó en la nomenclatura de Legler y Vogt (2013), y atendiendo la última actualización en taxonomía, sinonimia, distribución, estatus de conservación y lista anotada de las especies de tortugas dulceacuícolas en el mundo (Rhodin et al., 2021). Todas las especies fueron tratadas de acuerdo a los estándares bioéticos nacionales, cumpliendo con las normas oficiales mexicanas NOM-126-SEMARNAT-2000 y NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2019). Este documento se realizó con el permiso federal de colecta de SEMARNAT SGPA/DGVS/04315/11, y con la aprobación de la Comisión Institucional de Ética en Investigación “CIEI” con número de Folio: 0985, por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en México.

5.2.2. Muestra sanguínea y cultivo de linfocitos

Se extrajo 1 ml de sangre de la vena coccígea con una jeringa previamente heparinizada (Inhepar®) con aguja ultrafina de 6 mm y con capacidad de 100 unidades (1 ml) y desinfectando la zona de punción con etanol 70% (Haskell & Pokras 1994). El aislamiento de linfocitos se llevó a cabo aplicando la metodología modificada de Fujiwara et al. (2001), Rohilla et al. (2006), Majtánová et al. (2017) y a como se describe en el Capítulo 3 del presente trabajo, el cual consistió en añadir 3 ml de Ficol (Ficoll-Paque™ Plus

1.077±0.001 g/ml a 20 °C de GE Healthcare) a tubos de ensayo de 14 ml preparado previamente con 4 ml de la muestra sanguínea diluida en disolución salina en proporción 1:1 (sin mezclar el Ficol con la muestra sanguínea diluida). Los tubos fueron esterilizados previamente en una cámara de PCR UV 825-UVC (PlasLabs, Lansing, Michigan, USA) utilizando las lámparas germinicidas fluorescentes y luz ultravioleta durante 15 min. Luego se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm, seguidamente se extrajo el sobrenadante de plasma con la ayuda de micropipetas para dejar expuesto a la capa de células mononucleares.

Una vez extraído el plasma, con una jeringa estéril nueva se extrajo la capa de células mononucleares y se transfirió a un nuevo tubo con Medium preparado, que consistió en 5 ml de Medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (KREAvital Lymphocyte Karyotyping Medium que incluye PHA pKBI-90021 de Kreatech), 1% de solución antibiótica antimicótica con proporción de 0.5 mg/5 ml de Medio, Fitohemaglutinina-P (Lectina de *Phaseolus vulgaris* de Sigma-Aldrich®) en proporción 90 mg/5 ml de Medio, Benzatina bencilpenicilina (solución antibacteriana de Amsa Laboratorios®) con 0.3 mg/5 ml de Medio y 0.175 µl de metanol al 10%.

Las muestras de células blancas se dejaron en incubación por 72 h a temperatura de 28 °C en una incubadora Ecoshel DH2500AB de convección natural, con las siguientes condiciones de cultivo: 386±1.20 ppm de CO₂, Humedad Relativa de 52.10±2.33 % y 0.013±0.001 mg³/m³ de Compuestos Orgánicos Volátiles Totales (TVOC), parámetros que son fundamentales durante el desarrollo del cultivo celular *in vitro* de linfocitos. El CO₂ fue monitoreado para evitar el desbalance en los niveles de pH en el cultivo celular sanguíneo (Yang & Xiong, 2012; Mani, 2023). Por otra parte, la humedad relativa fue monitoreada para prevenir la desecación celular y ayudar la proliferación de linfocitos (Spurbeck et al., 1996; Zavala et al., 2017) y el TVOC para dar un seguimiento óptimo sobre el comportamiento de los gases, para detectar contaminación y proliferación de bacterias en el cultivo *in vitro* (Reese et al., 2020; Euler et al., 2022).

Los tubos del cultivo celular fueron agitados con ligereza durante repetidas ocasiones al día para favorecer la dispersión celular, la oxigenación y evitar la concentración o traslape de células en un punto específico del tubo (Prakash & Srivastava, 2008; Gallego-Murillo et al., 2022).

5.2.3. Protocolo de preparación cromosómica

Posterior a las 72 h de cultivo, se añadió 50 µl de colchicina al 0.1% diluida en citrato de sodio al 1% por cada 5 ml de Medium, agitando suavemente la preparación. Inmediatamente las muestras fueron incubadas a 28 °C durante 30 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 7000 r.p.m. durante 10 min; al finalizar este procedimiento, se descartó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta de polietileno, dejando únicamente el botón de células linfocitarias. Posteriormente, el botón celular fue removido cuidadosamente con ligeras vibraciones; después, se aplicó tratamiento con solución hipotónica de citrato de sodio al 1% (10 ml) y se dejó incubando a 28 °C por 60 min. Después, se añadió 2 ml de fijador frío 4 °C en proporción 4:1 (4 ml de metanol: 1 ml de ácido acético glacial) y se mezcló suavemente, dejando reposar durante 5 min. El siguiente paso, fue extraer 2 ml del cultivo de linfocitos preparado con la ayuda de una micropipeta y se transfirió a tubos de 2 ml de capacidad. Cada tubo fue centrifugado a 7000 r.p.m. durante 10 min y al finalizar, el sobrenadante fue eliminado, dejando únicamente el botón celular.

Posteriormente, se realizó el siguiente paso repitiéndolo tres veces: Se añadió 1.5 ml de fijador 3:1 (3 ml de metanol: 1 ml de ácido acético glacial) y con la ayuda de una pipeta de polipropileno se resuspendió el botón celular, dejando reposar a temperatura gélida de -18 °C durante 5 min, después se agitó la muestra para homogeneizar y se dejó en reposo durante 10 min a temperatura ambiente, después, cada tubo fue centrifugado a 7000 r.p.m. durante 10 min.

El último paso consistió en eliminar el sobrenadante, dejando únicamente el botón celular; luego se añadió 0.5 ml de solución hipotónica y 1 ml de fijador 3:1, para después resuspender las células y homogeneizar la muestra a temperatura ambiente. Posterior al tiempo de reposo de la muestra, se utilizó una placa térmica regulando la temperatura a 35 °C y se colocaron portaobjetos pretratados con etanol frío a 4 °C para realizar el goteo de las muestras (con choque térmico). Antes de realizar el goteo, la muestra se resuspendió con la ayuda de una pipeta de polipropileno para posteriormente realizar el goteo a una altura de 1.80 m. El secado de las muestras goteadas fue a temperatura ambiente.

5.2.4. Tinción de muestras

Cada muestra de portaobjeto fue debidamente etiquetada. Las preparaciones cromosómicas se dejaron envejecer por 12 h a temperatura ambiente. Después (utilizando el método estandarizado de tinción del Capítulo 1 en el presente trabajo), se llevó a cabo la tinción con Giemsa en solución madre a 4.0 °C (sin diluyente) con el empleo de cajas petri como base de soporte de los cubreobjetos. El tiempo de exposición de las muestras al colorante Giemsa fue de 10 s. Inmediatamente después, se retiró el exceso de colorante con la ayuda de una piseta y chorros de agua destilada. Luego, las muestras fueron colocadas en posición vertical sobre papel absorbente en un recipiente cilíndrico de polietileno para escurrir el exceso de agua durante el proceso de retiro y lavado del colorante. Todas las muestras fueron secadas a temperatura ambiente 29 ± 1.0 °C.

5.2.5. Microscopía óptica y conteo cromosómico

Se utilizó un microscopio óptico Axio Scope A1 (Carl Zeiss®), equipado con cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®), utilizando el objetivo de 10x para la búsqueda de dispersiones celulares de linfocitos y el objetivo de 40x + 1.25x optovar para la toma de microfotografías. Dicha búsqueda de dispersiones cromosómicas fue realizada tomando los criterios de selección cromosómica de Hernández-Guzmán (2018). Las mejores imágenes de campos cromosómicos fueron seleccionadas y tratadas para su optimización en el software ZEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011). El conteo de cada cromosoma en las dispersiones para determinar el número modal diploide $2n$ fue elaborado con el software ImageJ 1.53t (National Institutes of Health, USA) aplicando las herramientas de conteo por puntos individuales. Las matrices de cada conteo cromosómico fueron transferidos a bases de datos en el software de Microsoft® Office Excel LTSC Profesional Plus 2021.

5.2.6. Elaboración de cariotipos y estadística

Para determinar el cariotipo típico, se emplearon en total 30 metafases mitóticas de excelente calidad, 10 del pochitoque común *K. l. leucostomum* (5 de hembras + 5 de machos), 10 del pochitoque jahuactero *K. acutum* (5 de hembras + 5 de machos) y 10 del pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* (5 de hembras + 5 de machos). Las mejores imágenes de dispersiones cromosómicas fueron recortadas en cromosomas individuales, de los cuales se

tomaron las medidas en micrómetros (μm) del brazo corto (p) y brazo largo (q) que sirvieron de base para constituir los pares homólogos de cromosomas (cariotipo).

A los valores de p y q, de cada par homólogo de cromosomas, les fue calculada la media y desviación estándar y posteriormente se les calculó la longitud relativa (LR), es decir, la longitud promedio en μm de p ó de q, fue dividida por la sumatoria total de p más q del complemento cromosómico en μm , multiplicando el valor por 100.

Los cromosomas, se ordenaron con base en los parámetros bioestadísticos citogenéticos propuestos por Levan et al. (1964), como se describe a continuación: proporción de brazos $r=q/p$, índice centromérico $i=100(p/p+q)$ y la diferencia entre brazos cromosómicos $d=r-1(10)/r+1$, donde “p” corresponde al brazo corto y “q” al brazo largo. Con dichos parámetros, los cromosomas fueron clasificados de acuerdo con la siguiente tabla (Tabla 11) propuesta por Levan et al. (1964):

Tabla 11. Nomenclatura de clasificación cromosómica.

Clasificación	Valor r	Valor d
M	1	0
msm	1 - 3	0 - 5
stt	3 - ∞	5 - 10
T	∞	10

M= metacéntrico, msm= metacéntrico-submetacéntrico, stt= subtelocéntrico-telocéntrico, T= telocéntrico.

Los ideogramas fueron elaborados seleccionando las dispersiones cromosómicas para la elaboración del cariotipo estándar, tomando los caracteres morfométricos del brazo corto “p”, centrómero y brazo largo “q” de los cromosomas y calibrando las microfotografías a 10 μm , utilizando el software IdeoKar 1.3 de Mirzaghaderi y Marzangi (2015).

5.3. RESULTADOS

Se analizaron 629 dispersiones cromosómicas, siendo 244 de hembras y 385 de machos en el pochitoque común *K. l. leucostomum*. El número modal diploide en ambos sexos correspondió a $2n=56$ cromosomas, con el 93.9% del total de células analizadas en hembras, y con el 95.1% del total de células en individuos machos. Algunas dispersiones cromosómicas aisladas manifestaron 54 cromosomas y con porcentaje muy bajo, siendo 4.1% en hembras y 1.8% en machos. En otras dispersiones fue posible identificar el doble de

cromosomas con respecto al número modal, llegando a contabilizar hasta 112 cromosomas por dispersión; dicha característica fue observada con muy bajo porcentaje, es decir, 2.0% en hembras y 3.1% en individuos machos. El análisis de los parámetros citogenéticos de *K. l. leucostomum* permitió identificar la presencia de cromosomas birráneos y monorráneos, de los cuales, se identificaron 17 pares de cromosomas metacéntricos-submetacéntricos “msm” (del par 1 al 17) y 11 pares de cromosomas telocéntricos “T” (del par 18 al 28). Esta morfología cromosómica fue idéntica en ambos sexos.

En los pochitoques hembras, el primer par de cromosomas birráneos presentó medidas promedio de $1.41 \pm 0.06 \mu\text{m}$ del brazo corto “p” y $3.15 \pm 0.24 \mu\text{m}$ del brazo largo “q”, mientras que el último par de cromosomas birráneos presentaron medidas promedio de $0.48 \pm 0.08 \mu\text{m}$ del brazo “p” y $0.86 \pm 0.06 \mu\text{m}$. En cuanto a los cromosomas monorráneos, la longitud promedio fue de $1.01 \pm 0.08 \mu\text{m}$ en su primer par y $0.67 \pm 0.04 \mu\text{m}$ en su último par de cromosoma. Por otro lado, en los individuos machos los cromosomas birráneos midieron $2.20 \pm 0.33 \mu\text{m}$ en su primer par de cromosoma y $0.37 \pm 0.12 \mu\text{m}$ en su último par, mientras que los cromosomas monorráneos tuvieron la longitud promedio de $1.81 \pm 0.09 \mu\text{m}$ en su primer par y $0.60 \pm 0.08 \mu\text{m}$ en su último par de cromosoma (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros citogenéticos de los cromosomas homólogos en hembras y machos del pochitoque común *K. l. leucostomum*. Longitud promedio (μm), longitud relativa promedio (L.R.) y su clasificación.

Par Cromosómico	Longitud (μm) p $\pm$ D.E.	Longitud (μm) q $\pm$ D.E.	L.R. de p	L.R. de q	r	i	d	Clasificación
Hembras								
1	1.41 $\pm$ 0.06	3.15 $\pm$ 0.24	2.47	5.53	2.23	30.91	3.82	msm
2	1.34 $\pm$ 0.06	2.75 $\pm$ 0.17	2.35	4.82	2.05	23.75	3.28	msm
3	1.24 $\pm$ 0.07	2.50 $\pm$ 0.10	2.18	4.38	2.01	33.22	3.32	msm
4	1.19 $\pm$ 0.08	2.39 $\pm$ 0.14	2.08	4.19	2.02	33.14	3.31	msm
5	1.09 $\pm$ 0.06	2.24 $\pm$ 0.13	1.92	3.93	2.05	32.75	3.28	msm
6	1.06 $\pm$ 0.08	2.10 $\pm$ 0.13	1.85	3.67	1.98	33.54	3.35	msm
7	0.98 $\pm$ 0.08	1.94 $\pm$ 0.07	1.73	3.41	1.97	33.62	3.36	msm
8	0.94 $\pm$ 0.08	1.87 $\pm$ 0.08	1.65	3.28	1.98	33.51	3.35	msm
9	0.92 $\pm$ 0.10	1.81 $\pm$ 0.09	1.61	3.18	1.97	33.66	3.37	msm
10	0.88 $\pm$ 0.07	1.75 $\pm$ 0.07	1.55	3.06	1.98	33.59	3.36	msm
11	0.83 $\pm$ 0.06	1.68 $\pm$ 0.10	1.45	2.94	2.02	33.13	3.31	msm
12	0.80 $\pm$ 0.05	1.64 $\pm$ 0.08	1.40	2.87	2.05	32.80	3.28	msm
13	0.74 $\pm$ 0.05	1.57 $\pm$ 0.09	1.30	2.75	2.12	32.08	3.21	msm
14	0.71 $\pm$ 0.06	1.34 $\pm$ 0.09	1.24	2.34	1.89	34.64	3.46	msm
15	0.66 $\pm$ 0.07	1.24 $\pm$ 0.06	1.15	2.17	1.88	34.67	3.47	msm

16	0.59±0.05	1.16±0.07	1.04	2.03	1.96	33.76	3.38	msm
17	0.48±0.08	0.86±0.06	0.83	1.51	1.81	35.62	3.56	msm
18		1.01±0.08		1.77			10.0	T
19		0.95±0.06		1.66			10.0	T
20		0.91±0.05		1.60			10.0	T
21		0.89±0.05		1.56			10.0	T
22		0.86±0.03		1.50			10.0	T
23		0.83±0.03		1.46			10.0	T
24		0.81±0.03		1.42			10.0	T
25		0.80±0.03		1.40			10.0	T
26		0.76±0.04		1.34			10.0	T
27		0.72±0.02		1.26			10.0	T
28		0.67±0.04		1.18			10.0	T
Machos								
1	2.20±0.33	4.10±0.32	3.53	6.58	1.87	34.89	3.02	msm
2	1.46±0.12	2.82±0.11	2.35	4.52	1.92	34.21	3.42	msm
3	1.37±0.15	2.51±0.34	2.21	4.03	1.83	35.38	3.54	msm
4	1.16±0.11	2.62±0.17	1.87	4.21	2.25	30.76	3.08	msm
5	0.99±0.09	2.36±0.40	1.59	3.79	2.38	29.56	2.96	msm
6	0.90±0.06	2.46±0.16	1.45	3.95	2.72	26.85	2.69	msm
7	0.90±0.06	2.10±0.27	1.45	3.37	2.32	30.09	3.01	msm
8	0.87±0.05	1.96±0.32	1.40	3.15	2.25	30.73	3.07	msm
9	0.75±0.12	1.78±0.27	1.21	2.85	2.36	29.76	2.98	msm
10	0.69±0.13	1.57±0.08	1.11	2.51	2.26	30.65	3.06	msm
11	0.60±0.15	1.54±0.34	0.96	2.47	2.58	27.93	2.79	msm
12	0.57±0.13	1.53±0.13	0.91	2.46	2.70	27.02	2.70	msm
13	0.53±0.12	1.33±0.08	0.86	2.13	2.49	28.68	2.87	msm
14	0.50±0.14	1.24±0.11	0.80	2.00	2.49	28.69	2.87	msm
15	0.46±0.14	1.18±0.07	0.74	1.89	2.55	28.16	2.82	msm
16	0.44±0.14	1.11±0.02	0.70	1.79	2.54	28.25	2.82	msm
17	0.37±0.12	1.06±0.06	0.59	1.70	2.86	25.88	2.59	msm
18		1.81±0.09		2.91			10.0	T
19		1.68±0.11		2.70			10.0	T
20		1.58±0.08		2.54			10.0	T
21		1.45±0.08		2.33			10.0	T
22		1.38±0.09		2.22			10.0	T
23		1.30±0.07		2.09			10.0	T
24		1.25±0.06		2.00			10.0	T
25		1.21±0.05		1.94			10.0	T
26		1.12±0.04		1.79			10.0	T
27		0.88±0.08		1.41			10.0	T
28		0.60±0.08		0.96			10.0	T

D.E.= Desviación estándar, p= brazo corto de cromosoma, q= brazo largo de cromosoma, msm= metacéntrico-submetacéntrico, T= telocéntrico.

De acuerdo con los parámetros bioestadísticos citogenéticos, el armado del cariotipo y el ideograma (Figura 18, Figura 19), se logró identificar seis pares de cromosomas grandes (par 1 al 6), mientras que el resto de los pares homólogos de cromosoma resultaron ser de tamaño medio (par 7 al 17) y el resto correspondió a cromosomas de tamaño pequeño (par 18 al 28).

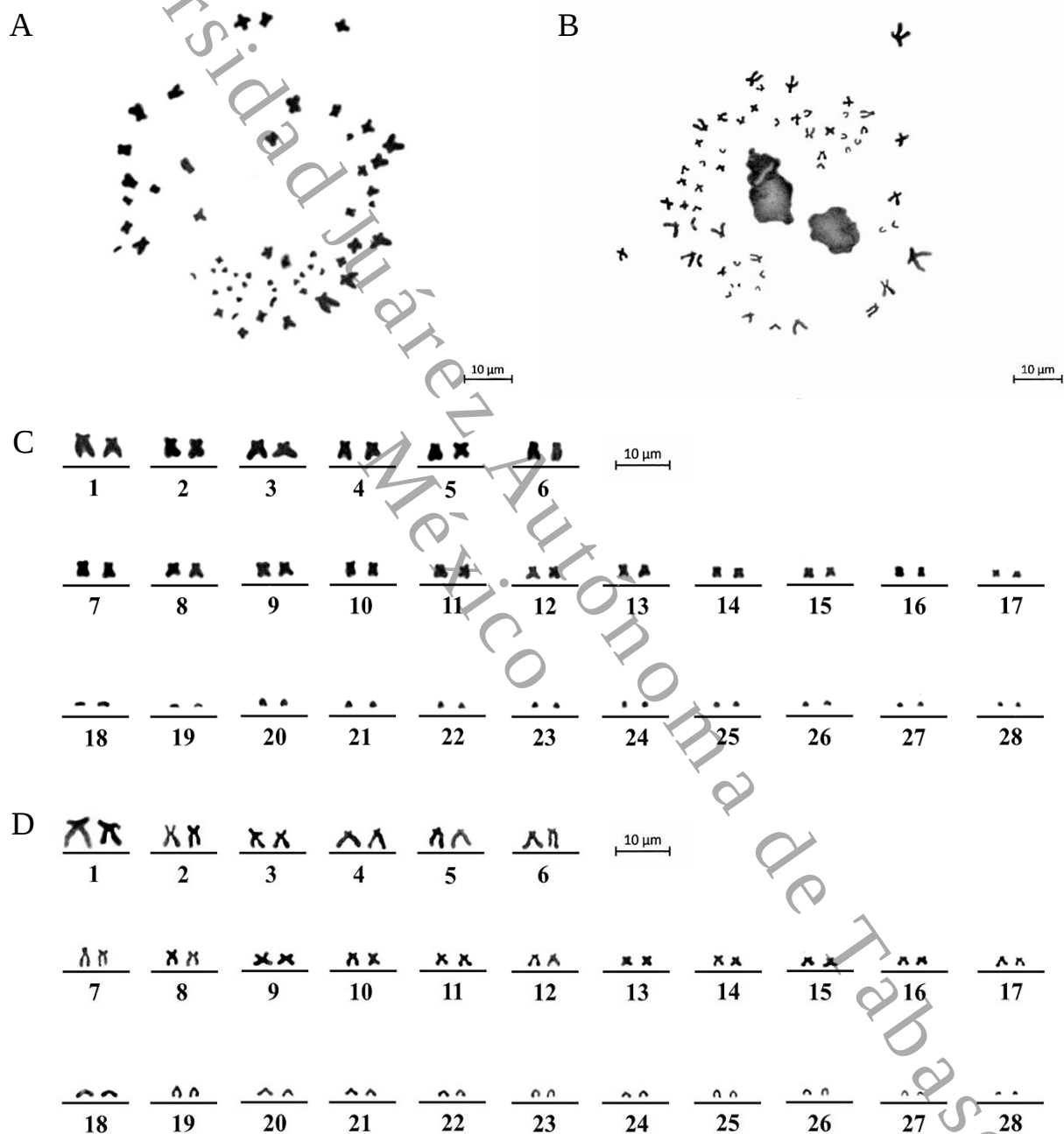


Figura 18. Dispersiones cromosómicas y cariotipo estándar de hembras (A y C) y machos (B y D) en el pochitoque común *K. l. leucostomum*. La barra equivale a 10 µm.

El número fundamental (NF) estandarizado en este estudio para el pochitoque común *K. l. leucostomum* corresponde a NF= 90, tanto para individuos hembras y machos. En esta investigación no se logró observar la presencia de cromosomas heteromórficos (Figura 18).

Adicionalmente, fue posible contabilizar cromosomas supernumerarios o microcromosomas “B” en 27 dispersiones celulares, los cuales fueron variables en ambos sexos. En las hembras se identificaron de 3 y hasta 5 microcromosomas B, mientras que en los individuos machos se contabilizaron de 2 y hasta 5 microcromosomas B (Tabla 13).

Tabla 13. Determinación cromosómica en mitosis de hembras y machos de la tortuga *K. l. leucostomum*.

Frecuencia cromosómica				
	2n= 54	2n= 56	2n= 112	Subtotal
Hembras	10 (4.1%)	229 (93.9%)	5 (2.0%)	244
Machos	7 (1.8%)	366 (95.1%)	12 (3.1%)	385
		Total	629	

Microcromosomas B					
	MB 2	MB 3	MB 4	MB 5	Subtotal
Hembras	0 (0.0%)	2 (28.6%)	4 (57.1%)	1 (14.3%)	7
Machos	1 (5.0%)	6 (30.0%)	6 (30.0%)	7 (35.0%)	20
		Total	27		

MB= microcromosomas “B”

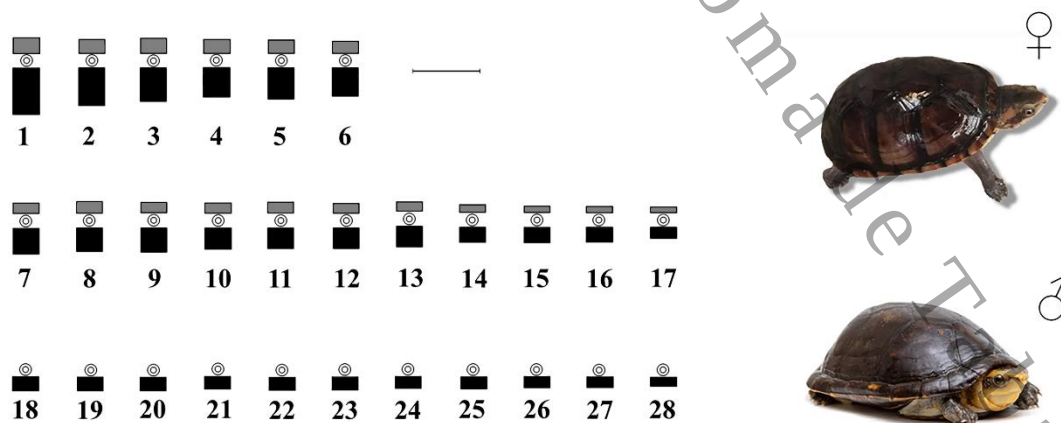


Figura 19. Ideograma de pares homólogos de cromosomas del cariotipo estándar en el pochitoque *K. l. leucostomum*. Representación del brazo p cromosómico (en gris), centrómero (circunferencia) y brazo q cromosómico (en negro). La barra equivale a 10 μ m.

En el pochitoque jahuactero *K. acutum* se identificaron 520 dispersiones cromosómicas, de los cuales, en los individuos hembras se analizaron 286 campos cromosómicos y en machos 234. Se logró estandarizar el número modal diploide, siendo $2n=56$ cromosomas el más frecuente con el 93.4% (267 dispersiones cromosómicas) en las hembras y el 96.6% (226 dispersiones) en los individuos machos. El porcentaje restante, se diversificó en dispersiones cromosómicas aisladas con 54 cromosomas y con porcentaje de 2.1% en hembras y 1.3% en individuos machos. También, se encontraron dispersiones con 58 cromosomas; lo cual, fue observada con muy bajo porcentaje de 4.5% en hembras y 2.1% en individuos machos. En esta especie solo se identificaron cromosomas birrámeos, siendo en total 56 cromosomas metacéntricos-submetacéntricos “msm”; esta condición fue observada en ambos sexos.

Los datos biométricos de los cromosomas birrámeos estuvieron conformados por tamaños promedio de 1.63 ± 0.19 μm de brazo “p” y 4.25 ± 0.41 μm de brazo “q” en sus primeros pares, mientras que, en su último par alcanzaron el tamaño promedio de 0.31 ± 0.08 μm de brazo “p” y en brazo “q” con promedio de 0.49 ± 0.05 μm en individuos hembras. En los ejemplares machos, los cromosomas tuvieron medida promedio de 1.65 ± 0.15 μm en el primer par de brazo corto y 4.05 ± 0.22 μm en su primer brazo largo, mientras que, los cromosomas finales tuvieron medidas promedio de 0.40 ± 0.04 μm de brazo “p” y 0.67 ± 0.10 μm de brazo “q”.

Tabla 14. Parámetros citogenéticos de los cromosomas homólogos en hembras y machos del pochitoque jahuactero *K. acutum*. Longitud promedio (μm), longitud relativa promedio (L.R.) y su clasificación.

Par Cromosómico	Longitud (μm) p $\pm$ D.E.	Longitud (μm) q $\pm$ D.E.	L.R. de p	L.R. de q	r	i	d	Clasificación
Hembras								
1	1.63 $\pm$ 0.19	4.25 $\pm$ 0.41	2.16	5.63	2.61	27.69	4.46	msm
2	1.37 $\pm$ 0.12	3.35 $\pm$ 0.14	1.82	4.44	2.45	29.03	4.19	msm
3	1.25 $\pm$ 0.05	3.15 $\pm$ 0.10	1.66	4.18	2.52	28.42	4.32	msm
4	1.19 $\pm$ 0.03	2.89 $\pm$ 0.05	1.57	3.83	2.44	29.08	4.18	msm
5	1.14 $\pm$ 0.05	2.71 $\pm$ 0.10	1.51	3.59	2.38	29.60	4.08	msm
6	1.10 $\pm$ 0.07	2.58 $\pm$ 0.11	1.46	3.42	2.34	29.93	4.01	msm
7	1.08 $\pm$ 0.08	2.49 $\pm$ 0.05	1.43	3.31	2.31	30.20	3.96	msm
8	1.02 $\pm$ 0.11	2.39 $\pm$ 0.10	1.36	3.16	2.33	29.99	4.00	msm
9	0.97 $\pm$ 0.09	2.35 $\pm$ 0.08	1.28	3.12	2.43	29.13	4.17	msm
10	0.93 $\pm$ 0.08	2.25 $\pm$ 0.06	1.23	2.99	2.43	29.19	4.16	msm
11	0.91 $\pm$ 0.06	2.16 $\pm$ 0.08	1.21	2.87	2.38	29.62	4.08	msm
12	0.86 $\pm$ 0.02	2.10 $\pm$ 0.09	1.13	2.79	2.46	28.92	4.22	msm
13	0.83 $\pm$ 0.05	1.99 $\pm$ 0.07	1.10	2.64	2.39	29.50	4.10	msm

14	0.76±0.03	1.82±0.06	1.01	2.41	2.39	29.52	4.10	msm
15	0.74±0.05	1.73±0.05	0.98	2.30	2.35	29.86	4.03	msm
16	0.71±0.03	1.61±0.04	0.93	2.13	2.28	30.52	3.90	msm
17	0.70±0.03	1.54±0.04	0.93	2.04	2.20	31.22	3.76	msm
18	0.68±0.04	1.49±0.05	0.90	1.97	2.18	31.41	3.72	msm
19	0.67±0.03	1.40±0.04	0.88	1.85	2.10	32.24	3.55	msm
20	0.63±0.06	1.36±0.06	0.83	1.80	2.17	31.52	3.70	msm
21	0.58±0.05	1.26±0.04	0.77	1.67	2.16	31.63	3.67	msm
22	0.58±0.05	1.16±0.09	0.77	1.54	2.00	33.31	3.34	msm
23	0.55±0.04	1.02±0.12	0.73	1.36	1.87	34.86	3.03	msm
24	0.49±0.05	0.87±0.06	0.65	1.15	1.76	36.18	2.76	msm
25	0.46±0.07	0.79±0.06	0.61	1.04	1.70	37.05	2.59	msm
26	0.40±0.07	0.72±0.05	0.53	0.96	1.79	35.83	2.83	msm
27	0.39±0.07	0.60±0.07	0.51	0.80	1.56	39.07	2.19	msm
28	0.31±0.08	0.49±0.05	0.42	0.64	1.55	39.16	2.17	msm
Machos								
1	1.65±0.15	4.05±0.22	1.99	4.88	2.45	28.96	4.21	msm
2	1.44±0.09	3.40±0.09	1.73	4.10	2.36	29.73	4.05	msm
3	1.31±0.09	3.27±0.07	1.58	3.94	2.50	28.59	4.28	msm
4	1.20±0.08	3.13±0.08	1.45	3.77	2.60	27.76	4.45	msm
5	1.09±0.07	2.96±0.09	1.31	3.57	2.72	26.91	4.62	msm
6	1.06±0.07	2.88±0.08	1.28	3.48	2.71	26.92	4.62	msm
7	1.03±0.05	2.78±0.07	1.24	3.35	2.70	27.03	4.59	msm
8	0.98±0.04	2.65±0.11	1.19	3.19	2.69	27.09	4.58	msm
9	0.94±0.03	2.45±0.06	1.14	2.95	2.60	27.81	4.44	msm
10	0.92±0.03	2.39±0.08	1.10	2.88	2.61	27.72	4.46	msm
11	0.90±0.03	2.31±0.08	1.09	2.79	2.56	28.10	4.38	msm
12	0.88±0.04	2.25±0.06	1.06	2.71	2.55	28.19	4.36	msm
13	0.85±0.03	2.20±0.05	1.02	2.66	2.60	27.81	4.44	msm
14	0.82±0.03	2.16±0.09	0.99	2.60	2.63	27.55	4.49	msm
15	0.79±0.00	2.10±0.10	0.95	2.53	2.67	27.22	4.56	msm
16	0.75±0.03	1.99±0.08	0.91	2.40	2.65	27.40	4.52	msm
17	0.73±0.00	1.79±0.12	0.88	2.16	2.45	28.97	4.21	msm
18	0.69±0.03	1.71±0.10	0.84	2.07	2.47	28.80	4.24	msm
19	0.64±0.04	1.64±0.08	0.78	1.97	2.54	28.24	4.35	msm
20	0.63±0.05	1.58±0.06	0.76	1.90	2.52	28.42	4.32	msm
21	0.61±0.04	1.53±0.07	0.74	1.84	2.50	28.57	4.29	msm
22	0.59±0.03	1.49±0.09	0.72	1.79	2.51	28.51	4.30	msm
23	0.56±0.04	1.39±0.11	0.68	1.68	2.47	28.86	4.23	msm
24	0.54±0.05	1.32±0.08	0.65	1.59	2.43	29.13	4.17	msm
25	0.53±0.05	1.24±0.08	0.64	1.49	2.33	30.06	3.99	msm
26	0.49±0.05	1.16±0.06	0.59	1.40	2.36	29.74	4.05	msm
27	0.45±0.06	0.95±0.17	0.55	1.15	2.10	32.27	3.55	msm
28	0.40±0.04	0.67±0.10	0.49	0.80	1.65	37.69	2.46	msm

D.E.= Desviación estándar, p= brazo corto de cromosoma, q= brazo largo de cromosoma, msm= metacéntrico-submetacéntrico.

Los parámetros bioestadísticos del cariotipo y el ideograma (Figura 20, Figura 21), se logró identificar seis pares de cromosomas grandes (par 1 al 6), mientras que el resto de los pares homólogos de cromosoma resultaron ser de tamaño medio (par 7 al 17) y el resto correspondió a cromosomas de tamaño pequeño (par 18 al 28).

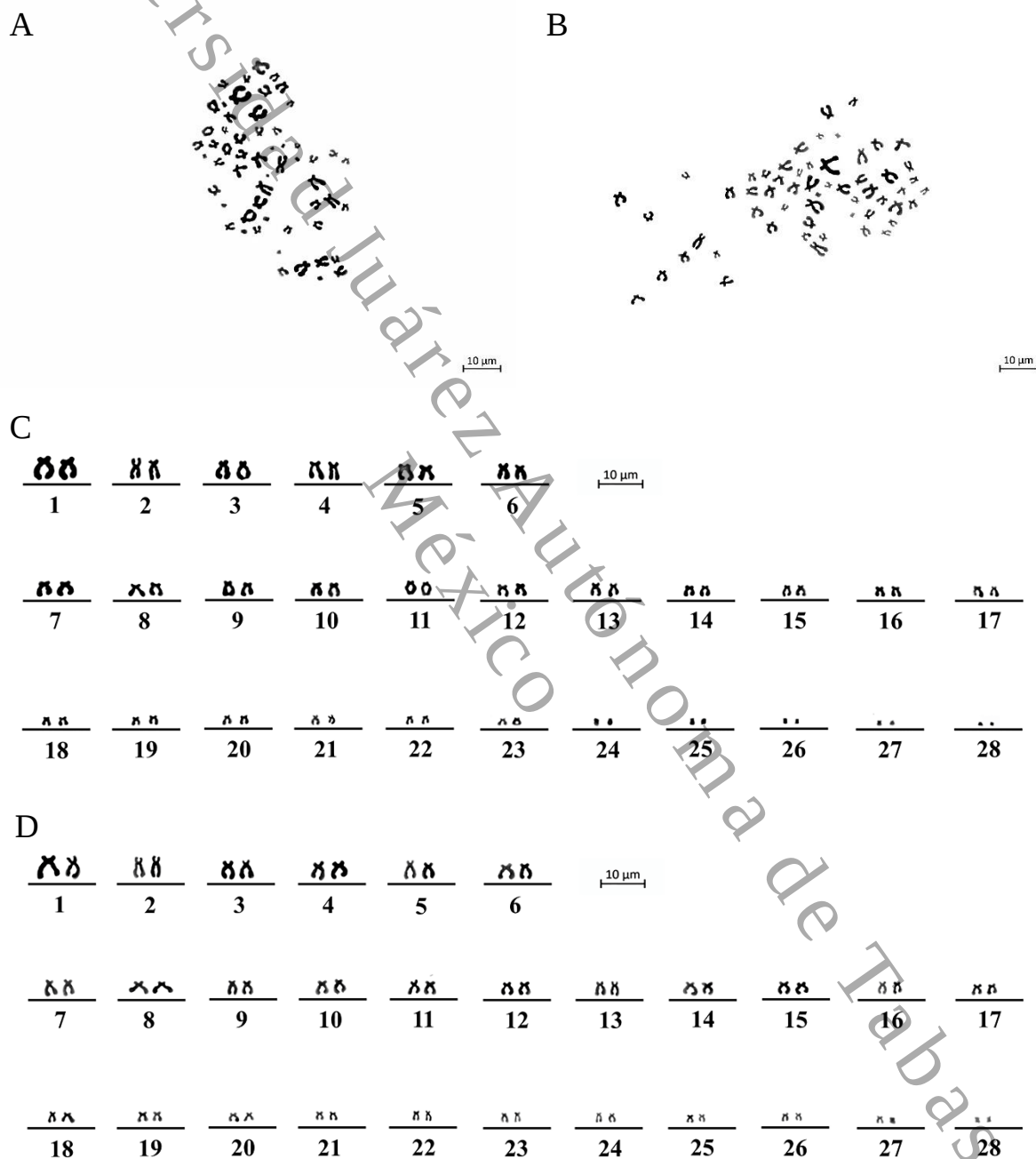


Figura 20. Dispersiones cromosómicas y cariotipo estándar de hembras (A y C) y machos (B y D) en el pochitoque jahuaactero *K. acutum*. La barra equivale a 10 μm.

El número fundamental (NF) que fue estandarizado en este trabajo para el pochitoque jahuaetero *K. acutum* fue de NF= 112, tanto para individuos hembras y machos. En esta investigación no se logró observar la presencia de cromosomas heteromórficos ó cromosomas sexuales, al igual que estructuras secundarias como los microcromosomas tipo “B” (Figura 21).

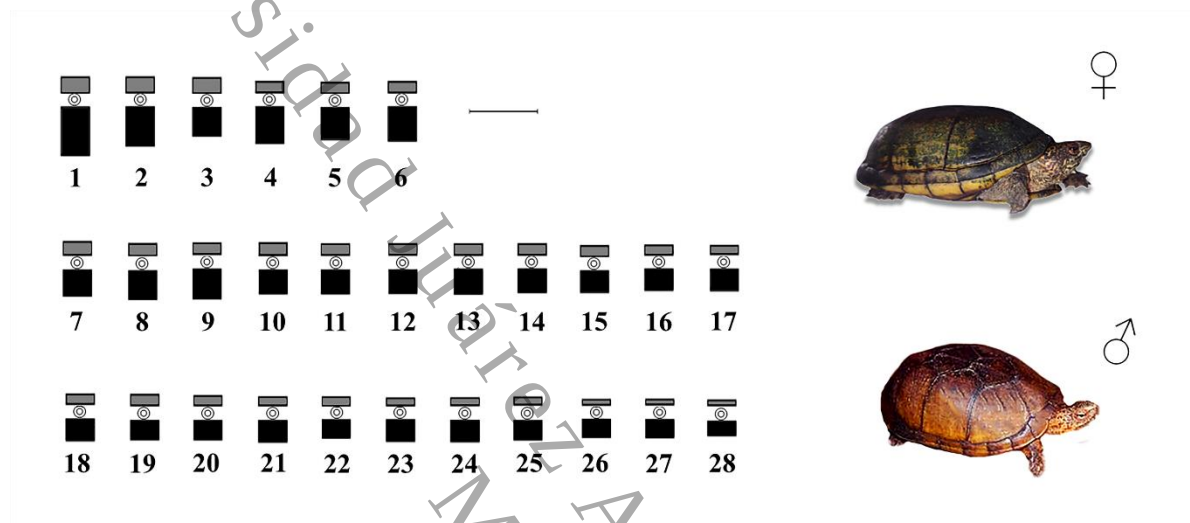


Figura 21. Ideograma de pares homólogos de cromosomas del cariotipo estándar en el pochitoque jahuaetero *K. acutum*. Representación del brazo p cromosómico (en gris), centrómero (circunferencia) y brazo q cromosómico (en negro). La barra equivale a 10 μ m.

En el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* se analizaron 539 dispersiones cromosómicas, en las hembras se contabilizaron 204 dispersiones y 335 en los machos. El número modal diploide en ambos sexos correspondió a $2n=56$ cromosomas, con el 96.6% del total de células analizadas en hembras, y 95.8% en individuos machos. Algunas dispersiones cromosómicas aisladas manifestaron 54 cromosomas con porcentaje de 2.0% en hembras y 1.5% en machos. En otras dispersiones fue posible identificar hasta 58 cromosomas por dispersión; dicha característica fue observada con muy bajo porcentaje, es decir, 1.5% en hembras y 2.7% en individuos machos. El análisis de los parámetros citogenéticos en el pochitoque escorpión permitió identificar la presencia de cromosomas birráneos, de los cuales, se identificaron 28 pares de cromosomas metacéntricos-submetacéntricos “msm”. Esta morfología cromosómica fue idéntica en ambos sexos.

En los pochitoques hembras, el primer par de cromosomas birráneos presentó medidas promedio de $1.83 \pm 0.15 \mu\text{m}$ del brazo corto “p” y $3.53 \pm 0.25 \mu\text{m}$ del brazo largo “q”, mientras que el último par de cromosomas birráneos presentaron medidas promedio de $0.58 \pm 0.06 \mu\text{m}$ del brazo “p” y $0.82 \pm 0.18 \mu\text{m}$ del brazo largo “q”. Por otro lado, en los individuos machos los cromosomas midieron en promedio $1.53 \pm 0.17 \mu\text{m}$ del brazo corto “p” y $3.89 \pm 0.59 \mu\text{m}$ del brazo largo “q” en su primer par de cromosoma, mientras que, en sus últimos pares las medidas promedio fueron $0.39 \pm 0.07 \mu\text{m}$ del brazo “p” y $0.96 \pm 0.07 \mu\text{m}$ del brazo largo “q” (Tabla 15).

Tabla 15. Parámetros citogenéticos de los cromosomas homólogos en hembras y machos del pochitoque escorpión *K. s. cruentatum*. Longitud promedio (μm), longitud relativa promedio (L.R.) y su clasificación.

Par Cromosómico	Longitud (μm) p $\pm$ D.E.	Longitud (μm) q $\pm$ D.E.	L.R. de p	L.R. de q	r	i	d	Clasificación
Hembras								
1	1.83 $\pm$ 0.15	3.53 $\pm$ 0.25	2.35	4.53	1.93	34.14	3.17	msm
2	1.55 $\pm$ 0.17	3.29 $\pm$ 0.19	1.99	4.22	2.12	32.04	3.59	msm
3	1.28 $\pm$ 0.23	3.01 $\pm$ 0.31	1.64	3.87	2.35	29.82	4.04	msm
4	1.25 $\pm$ 0.18	2.51 $\pm$ 0.28	1.60	3.23	2.01	33.20	3.36	msm
5	1.10 $\pm$ 0.18	2.48 $\pm$ 0.05	1.41	3.19	2.26	30.72	3.86	msm
6	1.02 $\pm$ 0.21	2.31 $\pm$ 0.19	1.31	2.97	2.26	30.66	3.87	msm
7	1.02 $\pm$ 0.19	2.42 $\pm$ 0.18	1.30	3.11	2.39	29.54	4.09	msm
8	1.02 $\pm$ 0.21	2.33 $\pm$ 0.13	1.30	2.99	2.29	30.36	3.93	msm
9	0.96 $\pm$ 0.18	2.16 $\pm$ 0.12	1.24	2.77	2.29	30.41	3.92	msm
10	0.94 $\pm$ 0.16	2.17 $\pm$ 0.10	1.21	2.78	2.25	30.75	3.85	msm
11	0.92 $\pm$ 0.17	2.05 $\pm$ 0.05	1.18	2.63	2.22	31.05	3.79	msm
12	0.91 $\pm$ 0.15	2.01 $\pm$ 0.05	1.17	2.58	2.20	31.22	3.76	msm
13	0.89 $\pm$ 0.12	2.02 $\pm$ 0.25	1.15	2.59	2.26	30.68	3.86	msm
14	0.87 $\pm$ 0.12	1.83 $\pm$ 0.08	1.12	2.35	2.10	32.23	3.55	msm
15	0.86 $\pm$ 0.11	1.76 $\pm$ 0.07	1.11	2.26	2.03	32.99	3.40	msm
16	0.82 $\pm$ 0.12	1.71 $\pm$ 0.11	1.10	2.19	2.09	32.33	3.53	msm
17	0.86 $\pm$ 0.11	1.62 $\pm$ 0.12	1.05	2.08	1.89	34.63	3.07	msm
18	0.81 $\pm$ 0.11	1.40 $\pm$ 0.31	1.04	1.80	1.73	36.58	2.68	msm
19	0.79 $\pm$ 0.09	1.39 $\pm$ 0.33	1.01	1.79	1.76	36.17	2.77	msm
20	0.77 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.33	0.99	1.74	1.75	36.33	2.73	msm
21	0.74 $\pm$ 0.06	1.36 $\pm$ 0.37	0.95	1.78	1.87	34.86	3.03	msm
22	0.73 $\pm$ 0.07	1.25 $\pm$ 0.30	0.93	1.60	1.72	36.82	2.64	msm
23	0.70 $\pm$ 0.07	1.18 $\pm$ 0.30	0.90	1.52	1.68	37.29	2.54	msm
24	0.68 $\pm$ 0.07	1.13 $\pm$ 0.27	0.88	1.45	1.66	37.66	2.47	msm
25	0.66 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.22	0.85	1.35	1.59	38.63	2.27	msm
26	0.63 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.22	0.81	1.26	1.54	39.33	2.13	msm
27	0.61 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.21	0.78	1.17	1.50	40.06	1.99	msm

28	0.58±0.06	0.82±0.18	0.74	1.05	1.42	41.24	1.75	msm
Machos								
1	1.53±0.17	3.89±0.59	2.07	5.27	2.55	28.20	4.36	msm
2	1.18±0.09	3.40±0.21	1.59	4.60	2.89	25.71	4.86	msm
3	1.05±0.08	2.81±0.39	1.43	3.81	2.67	27.27	4.55	msm
4	0.98±0.08	2.76±0.26	1.33	3.74	2.81	26.23	4.75	msm
5	0.94±0.03	2.61±0.22	1.28	3.53	2.77	26.56	4.69	msm
6	0.90±0.04	2.42±0.33	1.21	3.28	2.70	27.04	4.59	msm
7	0.87±0.06	2.46±0.27	1.18	3.33	2.81	26.22	4.76	msm
8	0.85±0.09	2.36±0.16	1.10	3.20	2.91	25.57	4.89	msm
9	0.81±0.10	2.06±0.27	1.15	2.80	2.44	29.09	4.18	msm
10	0.80±0.04	1.94±0.23	1.09	2.63	2.42	29.23	4.15	msm
11	0.79±0.10	1.88±0.20	1.03	2.55	2.47	28.79	4.24	msm
12	0.78±0.05	1.87±0.14	1.07	2.53	2.37	29.66	4.07	msm
13	0.77±0.05	1.76±0.21	1.05	2.38	2.27	30.60	3.88	msm
14	0.77±0.04	1.71±0.16	1.04	2.32	2.24	30.91	3.82	msm
15	0.76±0.04	1.63±0.17	1.04	2.21	2.13	31.95	3.61	msm
16	0.72±0.04	1.60±0.16	0.97	2.09	2.16	31.69	3.66	msm
17	0.73±0.08	1.54±0.16	0.99	2.17	2.20	31.27	3.75	msm
18	0.68±0.05	1.47±0.11	0.92	1.99	2.15	31.73	3.65	msm
19	0.65±0.05	1.46±0.08	0.87	1.98	2.27	30.62	3.88	msm
20	0.63±0.04	1.39±0.07	0.85	1.88	2.21	31.17	3.77	msm
21	0.61±0.04	1.36±0.08	0.83	1.84	2.22	31.05	3.79	msm
22	0.60±0.03	1.32±0.10	0.81	1.78	2.21	31.14	3.77	msm
23	0.57±0.04	1.25±0.15	0.77	1.69	2.20	31.26	3.75	msm
24	0.53±0.06	1.25±0.07	0.71	1.69	2.36	29.77	4.05	msm
25	0.51±0.02	1.16±0.16	0.69	1.58	2.28	30.47	3.91	msm
26	0.51±0.06	1.13±0.09	0.68	1.53	2.23	30.95	3.81	msm
27	0.46±0.05	1.03±0.10	0.62	1.39	2.23	30.92	3.82	msm
28	0.39±0.07	0.96±0.07	0.53	1.30	2.44	29.08	4.18	msm

D.E.= Desviación estándar, p= brazo corto de cromosoma, q= brazo largo de cromosoma, msm= metacéntrico-submetacéntrico.

A través de los parámetros bioestadísticos citogenéticos del cariotipo y el ideograma en el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* (Figura 22, Figura 23), se logró identificar seis pares de cromosomas grandes (par 1 al 6). El resto de los pares homólogos de cromosoma resultaron ser de tamaño medio (par 7 al 17) y el resto correspondió a cromosomas de tamaño pequeño (par 18 al 28).

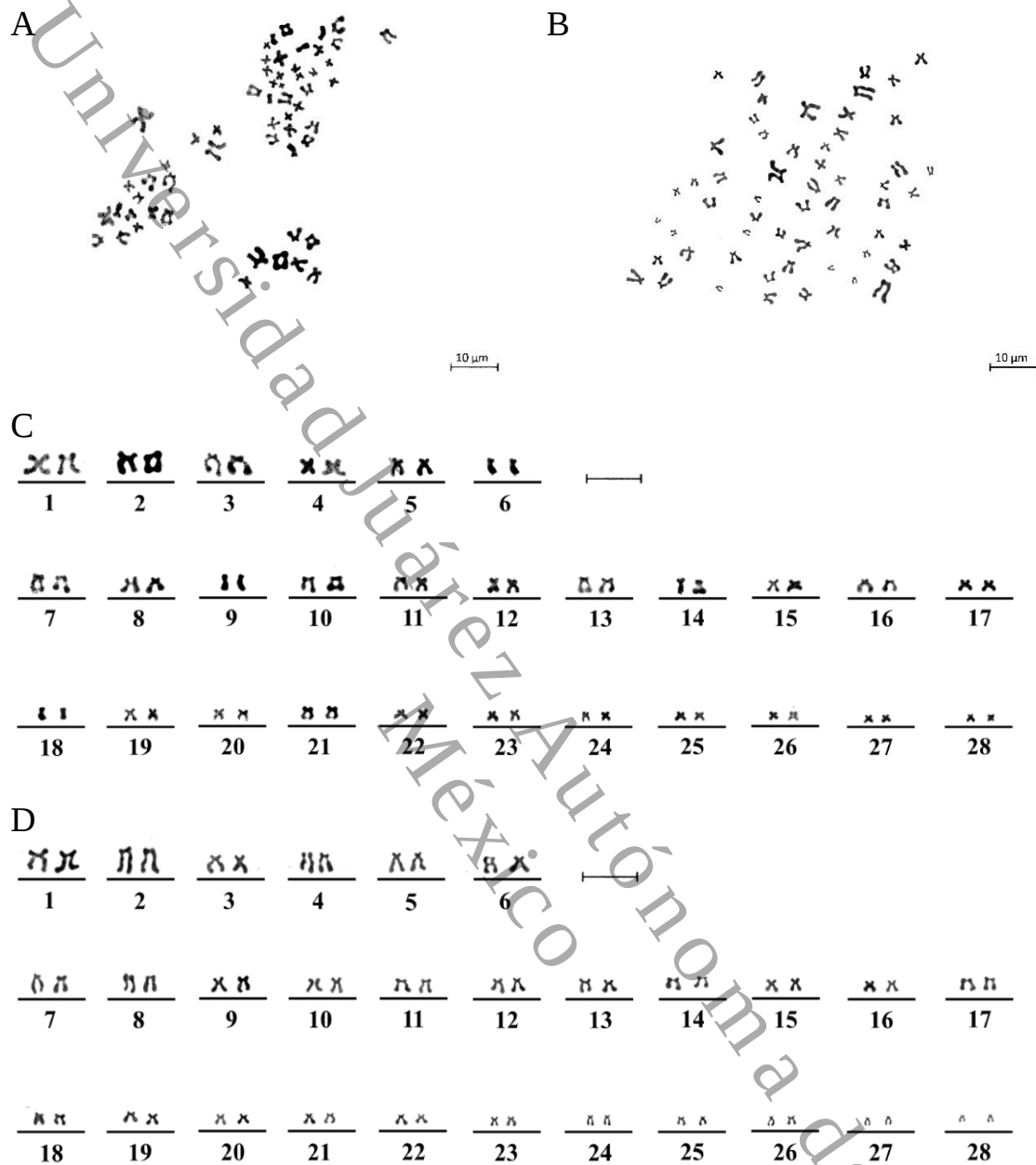


Figura 22. Dispersiones cromosómicas y cariotipo estándar de hembras (A y C) y machos (B y D) en el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum*. La barra equivale a 10 µm.

El número fundamental (NF) estandarizado en este estudio para el pochitoque escorpión corresponde a NF= 112 para individuos hembras y machos. En esta investigación no se logró observar la presencia de cromosomas heteromórficos, ni otras estructuras secundarias al complemento cariotípico (Figura 23).

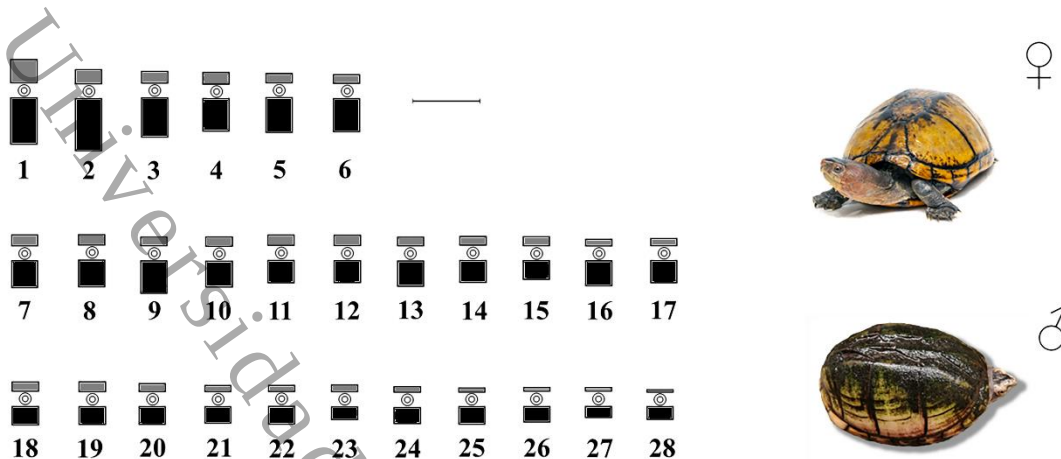


Figura 23. Ideograma de pares homólogos de cromosomas del cariotipo estándar en el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum*. Representación del brazo p cromosómico (en gris), centrómero (circunferencia) y brazo q cromosómico (en negro). La barra equivale a 10 μ m.

5.4. DISCUSIÓN

El estudio citogenético en las tres especies de pochitoques que se distribuyen en el estado de Tabasco, en México, indicó que la cantidad de cromosomas que poseen las células mitóticas como en los linfocitos es de $2n=56$ cromosomas, lo que es congruente con los reportes tempranos en diferentes especies de tortugas dulceacuícolas en kinosternidos por Barros et al. (1972), Killebrew (1975), Sites et al. (1979) y los estudios más recientes en dicha familia por Hernández-Guzmán (2018) y Hernández-Guzmán et al. (2019).

De acuerdo con la última investigación citogenética previo al presente estudio, el pochitoque común *K. l. leucostomum* podría tener poblaciones genéticamente diferentes, evidenciado por la composición cariotípica particular, a través de la morfología y morfometría de los cromosomas, tema que fue abordado por primera ocasión en el estudio de Hernández-Guzmán et al. (2014, 2015), ya que, en dichos trabajos se logró describir cromosomas birrámeos y monorrámeos en los cariotipos de dos poblaciones diferentes en el estado de Tabasco, sureste de México, así como diferencias en la clasificación cromosómica, esta condición fue reveladora, ya que previamente, solo se habían descrito cromosomas de tipo

birrámicos en *K. l. leucostomum* (Gorman, 1973; Moon, 1974), así como en la especie hermana *K. l. postinguinale* (Killebrew, 1975).

Puntualmente, las diferencias a nivel de clasificación cromosómica en el pochitoque común radican en lo siguiente: mientras que las poblaciones reportadas por Gorman (1973), Moon (1974) y Killebrew (1975) describen únicamente cromosomas birrámicos de tipo Macrocromosomas “M” y microcromosomas “m” (26 M + 30 m), Hernández-Guzmán et al. (2014, 2015) describen dos clasificaciones distintas, la primera constituida por la fórmula 12 metacéntrico-submetacéntrico “msm” + 22 subtelocéntrico-telocéntrico “stt” + 22 telocéntrico “T”, la segunda constituida por la fórmula 34 msm + 22 T, siendo esta última, idéntico a lo encontrado en el presente estudio. Por otro lado, algunas especies de kinosternidos donde si se ha encontrado cromosomas telocéntricos “T” (cromosomas monorrámicos), son las tortugas *K. flavescens*, *K. subrubrum subrubrum*, *Sternotherus odoratus* y *S. carinatus*, donde se ha reportado la presencia de cromosomas “T” en el cariotipo de dichas especies (Stock, 1972; Killebrew, 1975).

Con respecto al número fundamental, el presente estudio también estuvo conformado por NF=90 como se describió en los trabajos de Hernández-Guzmán et al. (2014, 2015) para organismos y poblaciones de Tabasco, en el sureste mexicano, lo que ratifica las diferencias citogenéticas con otras especies como *K. flavescens*, *K. subrubrum*, *S. odoratus* y *S. carinatus*, los cuales están constituidos por NF=80 (Stock, 1972).

De todos los reportes existentes en citogenética de los kinosternidos, solo en el pochitoque común se han descubierto estructuras secundarias como los microcromosomas tipo “B” Hernández-Guzmán et al. (2014). El número de cromosomas supernumerarios o microcromosomas “B” puede variar, ya que son microestructuras con ADN que no cumplen con la segregación mendeliana (Houben, 2017; Houben et al., 2019), por lo que, en *K. l. leucostomum* se ha reportado de 1 a 4 cromosomas supernumerarios “B” (Hernández-Guzmán et al., 2014) y en el presente estudio se lograron identificar de 2 hasta 5 microcromosomas “B”.

Estos cromosomas supernumerarios en las células mitóticas, puede tener diferentes orígenes, como la asimetría de los microtúbulos que ocasionan deformación en su estructura y un mecanismo defectuoso durante la anafase de acuerdo con Houben (2017), también, pueden

tener su origen como subproducto de la reestructuración del genoma, siendo una evidencia probable de un remanente de genoma ancestral, es decir, posiblemente los microcromosomas “B” sea una muestra de cómo los cromosomas evolucionan a través del tiempo (Houben et al., 2019); por ello, se ha sugerido que los microcromosomas han llegado a fusionarse con otros microcromosomas o con otros cromosomas grandes del complemento cromosómico “A” (Waters et al., 2021), razón por la que en tortugas se han perdido algunos de estos cromosomas o microcromosomas (Waters et al., 2021), lo que explicaría que especies como *Staurotypus triporcatus*, *S. salvini* y *Claudius angustatus* posean células somáticas $2n=54$ en lugar de $2n=56$ cromosomas como el resto de las especies de la familia Kinosternidae (Bickham & Carr, 1983; Kawagoshi et al., 2014). Por esta última condición, se ha planteado que los cromosomas sexuales en las tortugas *S. triporcatus* y *S. salvini*, los cuales son las únicas especies con heteromorfismo cromosómico en la familia Kinosternidae, pueden tener su origen en los microcromosomas (Sites et al., 1979), hipótesis que es apoyado por los últimos estudios en dichas especies por Kawagoshi et al. (2014), Radhakrishnan y Valenzuela (2017), donde definen que los cromosomas sexuales en *S. triporcatus* y *S. salvini* se encuentra en una etapa temprana de diferenciación. Otros autores, han señalado que posiblemente los cromosomas supernumerarios sea el resultado ocasional de hibridación interespecífica (Martis et al., 2012), incluso hasta un subproducto generado por la contaminación constante del ambiente en el que interactúan dichas especies con estas características (Hernández-guzmán et al., 2014).

En este estudio, así como en los reportes previos de citogenética en *K. l. leucostomum* (Killebrew, 1975; Hernández-Guzmán et al., 2014; 2015), no se encontraron cromosomas sexuales, y esto es debido a que la determinación sexual en esta especie es por el mecanismo de variación de temperatura de incubación, también conocida como la determinación del sexo dependiente de la temperatura “TSD”, el cual es considerada un mecanismo primitivo en las tortugas (Vogt & Bull, 1982; Ewert & Nelson, 1991; Kawagoshi et al., 2014). La gran mayoría de los Testudines posee este mecanismo de determinación sexual, y se contrasta con 18 especies confirmadas que poseen el mecanismo de determinación genotípica del sexo “GSD” considerado un mecanismo relativamente moderno por Vogt y Bull (1982), de los cuales, y como ya se mencionó anteriormente, las tortugas *S. triporcatus* y *S. salvini* son las únicas que poseen cromosomas sexuales diferenciados en la familia Kinosternidae, mientras

que la otra especie que tiene dicho mecanismo es la tortuga taimán *C. angustatus* pero no posee cromosomas sexuales diferenciados (Kawagoshi et al., 2014).

En otro contexto, el presente estudio citogenético en el pochitoque jahuactero *K. acutum* resulta ser el primero en su tipo. El número modal diploide de esta especie es idéntico a los kinosternidos con $2n=56$ cromosomas, sin embargo, el cariotipo que representa a esta especie de pochitoque, resulta diferente a las clasificaciones cromosómicas descritas previamente en *K. l. leucostomum* por Hernández-Guzmán et al. (2014, 2015), ya que el pochitoque jahuactero *K. acutum* presenta 56 cromosomas metacéntricos-submetacéntricos “msm” vs 34 cromosomas tipo “msm” del pochitoque *K. l. leucostomum*, además, manifestándose estas diferencias en el número fundamental, siendo $NF=112$ en *K. acutum* vs $NF=90$ en *K. l. leucostomum* de Hernández-Guzmán et al. (2014, 2015). En comparación con otros estudios de citogenética tempranos en la familia Kinosternidae, Killebrew (1975) y Sites et al. (1979), señalan que varias especies como *K. l. postinguinale*, *K. hirtipes hirtipes*, *K. flavescens*, *K. baurii*, *K. subrubrum hippocrepsis*, *K. steindachneri*, *Sternotherus carinatus*, *S. odoratus* y *S. minor* poseen 24 cromosomas “msm” ó $16 \text{ sm} + 8 \text{ st}$, así como 32 cromosomas T, con número fundamental $NF=80$.

Con respecto al pochitoque escorpión *K. s. cruentatum*, su clasificación cromosómica resultó ser idéntico al pochitoque jahuactero *K. acutum* en el presente estudio, con el mismo número diploide $2n=56$ cromosomas, con clasificación cromosómica idéntica de 56 cromosomas tipo msm, incluso, la morfología y morfometría de los cromosomas resulta muy similar, ya que en ambas especies, los pares cromosómicos del 1 al 6, resultan ser cromosomas relativamente grandes, mientras que los pares cromosómicos del 7 al 28 son considerablemente pequeños (Tabla 14 y 15; Figura 20 y 22). A esto se suma que el número fundamental de ambas especies también fue idéntico con $NF=112$. Además, estos caracteres descubiertos en *K. s. cruentatum* de Tabasco, en el sureste mexicano son reveladores, ya que contrastan con lo reportado por Killebrew (1975) en la misma especie con 24 cromosomas “msm” + 32 cromosomas T y número fundamental $NF=100$, datos que reportó de igual manera para la especie hermana *K. s. scorpioides*.

Posiblemente, la variación cariotípica del pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* de Tabasco con otros reportes como los de Barros et al. (1972), Killebrew (1975) y Sites et al. (1979), se

deba a diferentes factores, una de ellas se deba a la nomenclatura utilizada en la época en que fueron publicado los primeros estudios, ya que, debido a que las tortugas dulceacuícolas poseen en su complemento cariotípico un conjunto de cromosomas diminutos y a la falta de herramientas tecnológicas que permitieran una resolución adecuada para la toma de microfotografías, era difícil identificar la morfología y la morfometría de dichos cromosomas diminutos, por ello, Bickham (1975), creó una nomenclatura a partir del trabajo de Levan et al. (1964) para ajustar y agrupar a los cromosomas grandes y pequeños, a los cuales denominó, cromosomas tipo A, tipo B y tipo C, donde a estos últimos los consideró microcromosomas, los cuales como característica principal era la nula capacidad de distinguir los brazos p y q, así como el centrómero de los cromosomas, teniendo como consecuencia de que todo aquel cromosoma pequeño que no fuera posible distinguir dichos parámetros se agruparían como microcromosomas ó cromosomas tipo C (Bickham, 1975). Esto en principio pareció una solución al problema de la clasificación de cromosomas en las tortugas dulceacuícolas, sin embargo, con el tiempo y el avance tecnológico en la microscopía, las nuevas existencias de herramientas complementarias al microscopio como los softwares especializados en citogenética y las técnicas modernas en citogenética han permitido una mejor comprensión y un mejor análisis cariomorfológico en las especies, por lo que, ahora es posible identificar la totalidad de los cromosomas que posee una célula (Hernández-Guzmán, 2018; Hernández-Guzmán et al., 2014; Hernández-Guzmán & Arias-Rodriguez, 2024).

Otra causa podría ser la diferenciación entre poblaciones, ya que, a como se ha confirmado la variación cariotípica en el pochitoque común *K. l. leucostomum*, también en el pochitoque escorpión podrían haber más de un cariotipo entre las poblaciones de diferentes zonas geográficas, esto podría tomar aún más fuerza, ya que en los últimos años se ha encontrado evidencia de cambios genéticos en *K. scorpioides* y sus diferentes taxas, llegando a sugerirse la posible presencia de nuevas especies crípticas (Caballero et al., 2022). A este planteamiento, se suma el estudio más reciente en *K. scorpioides*, donde estudios de genética molecular y la implementación de árboles filogenéticos se develó nuevos linajes de subespecies en *K. scorpioides*, redefiniendo a las tortugas escorpiones en su genética y en la taxonomía (Hurtado-Gómez et al., 2024).

Por último, el pochitoque jahuactero *K. acutum* y el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* se suman a la gran mayoría de las especies de los kinosternidos que no posee cromosomas sexuales, aunque ciertamente en sus cariotipos se pueden encontrar cromosomas grandes en las tres especies de pochitoques presentados en este estudio y que incluso en *K. leucostomum* posea variación cromosómica (birrámeos y monorrámeos) no existe evidencia de caracteres heteromórficos diferenciados, por lo que su mecanismo de determinación sexual se basa en las variaciones de temperatura “mecanismo TSD” como ha sido documentado por Valenzuela (2004) y trabajos pioneros en reproducción y mecanismos de determinación sexual en las tortugas dulceacuícolas por Bull (1980), Vogt y Bull, (1982), Ewert y Nelson (1991).

En conclusión, las tres especies de pochitoques presentaron el mismo número de cromosomas diploides $2n=56$ cromosomas, sólo el pochitoque común *K. l. leucostomum*, presenta dos tipos de cromosomas (birrámeos y monorrámeos) con $NF=90$, mientras que el pochitoque jahuactero *K. acutum* y el pochitoque escorpión sólo presentan cromosomas birrámeos con $NF=112$. El pochitoque común *K. l. leucostomum* puede ser considerado como una de las especies modelos para el estudio de la evolución cromosómica en las tortugas dulceacuícolas, basado en la fusión de cromosomas monorrámeos y respaldado por teorías citogenéticas tempranas en los kinosternidos, así como evidencias por análisis filogenéticos actuales en la familia Kinosternidae que complementan el presente estudio. Se describió el cariotipo inédito del pochitoque jahuactero *K. acutum*, conformado por 56 cromosomas de tipo metacéntricos-submetacéntricos “msm” y se descubrió variación cariotípica en el pochitoque escorpión *K. s. cruentatum* en comparación con otras poblaciones reportadas previamente. Se descartó la presencia de cromosomas heteromórficos en las tres especies de tortugas dulceacuícolas.

5.5. REFERENCIAS

- Agbleke, A.A., Amitai, A., Buenrostro, J.D., Chakrabarti, A., Chu, L., Hansen, A.S., Koenig, K.M., Labade, A.S., Liu, S., Nozaki, T., Ovchinnikov, S., Seeber, A., Shaban, H.A., Spille, J.H., Stephens, A.D., Su, J.H. & Wadduwage, D. 2021. Advances in chromatin and chromosome research: perspectives from multiple fields. *Molecular Cells*. 79(6): 881-901.
- Balajee, A.S. & Hande, M.P. 2018. History and evolution of cytogenetic techniques: current and future applications in basic and clinical research. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 836: 3-12.
- Barros, R.M., Ayres, M., Sampaio, M.M., Cunha, O. & Assis, F. 1972. Karyotypes of two species of turtles from the Amazon region of Brazil. *Caryologia*. 25(4): 463-469.
- Bickham, J.W. & Carr, J.L. 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia*. 1983(4): 918-932.
- Bickham, J.W. 1975. A cytosystematic study of turtles in the Genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. *Herpetologica*. 31: 198-204.
- Bull, J.J. 1980. Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology*. 55(1): 3-21.
- Caballero, S., Martínez, J.G., Morales-Betancourt, M.A., Bolaños, N. & Lasso, C.A. 2022. Genomic analyses of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*) (Linnaeus, 1766) in insular and continental Colombia: evidence for multiple conservation and taxonomic units. *Frontiers in Conservation Science*. 3: 938040.
- Chadarevian, S. 2015. Chromosome photography and the human karyotype. *Historical Studies in the Natural Sciences*. 45(1): 115-146.
- Deakin, J.E. & Ezaz, T. 2019. Understanding the evolution of reptile chromosomes through applications of combined cytogenetics and genomics approaches. *Cytogenetic and Genome Research*. 157(1-2): 7-20.
- Ewert, M.A. & Nelson, C.E. 1991. Sex determination in turtles: diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia*. 1991(1): 50-69.
- Gorman, G.C. 1973. The chromosomes of the reptilian, a cytotaxonomic interpretation. En: Chiarelli, A.B. & Capanna, E. (Eds.). *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Pp. 347-424. Editorial Academic Press. New York, USA.

- Hernández-Guzmán, J. & Arias-Rodriguez, L. 2019. Los estudios de citogenética básica en la herpetofauna nativa de Tabasco. *Kuxulkab´*. 25(53): 27-39.
- Hernández-Guzmán, J. & Arias-Rodriguez, L. 2024. Cariotipo de *Incilius valliceps* (Anura: Bufonidae) y hallazgo de cromosomas sexuales (ZW/ZZ) revelados en macho fenotípico. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 11(3): 4121.
- Hernández-Guzmán, J. 2018. Caracterización cromosómica de las tortugas *Kinosternon leucostomum*, *Staurotypus triporcatus* y *Trachemys scripta* nativas de Tabasco, México. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. 52 p.
- Hernández-Guzmán, J., Arias-Trinidad, A., Islas-Jesús, R.E., Fraire-Vázquez, A., De la Cruz-Izquierdo, R.I., García-Guzmán, N.C. & Ruiz, X. 2015. Cromosomas, lesión del ADN y malformación nuclear en la tortuga dulceacuícola *Kinosternon leucostomum* (Testudines: Kinosternidae). *The Biologist*. 13(2): 201-211.
- Hernández-Guzmán, J., Indy, J.R., Yasui, G.S. & Arias-Rodriguez, L. 2014. Los cromosomas de las tortugas tropicales: *Kinosternon leucostomum*, *Staurotypus triporcatus* y *Trachemys scripta* (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). *Revista de Biología tropical*. 62: 671-688.
- Houben, A. 2017. B chromosomes – A matter of chromosome drive. *Frontiers in Plant Science*. 8: 210.
- Houben, A., Jones, N., Martins, C. & Trifonov, V. 2019. Evolution, composition and regulation of supernumerary B chromosomes. *Genes*. 10: 161.
- Hurtado-Gómez, J.P., Vargas-Ramírez, M., Iverson, J.B., Joyce, W.G., McCranie, J.R., Paetzold, C. & Fritz, U. 2024. Diversity and biogeography of South American mud turtles elucidated by multilocus DNA sequencing (Testudines: Kinosternidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 197: 108083.
- Kang, J.U. 2018. Overview of cytogenetic technologies. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. 50: 375-381.
- Kawagoshi, T., Uno, Y., Nishida, C. & Matsuda, Y. 2014. The *Staurotypus* turtles and aves share the same origin of sex chromosomes but evolved different types of heterogametic sex determination. *PLOS ONE*. 9(8): e105315.

- Killebrew, F.C. 1975. Mitotic chromosomes of turtles. III. The Kinosternidae. *Herpetologica*. 31: 398-403.
- Kirov, I., Khrustaleva, L., Van Laere, K., Soloviev, A., Meeus, S., Romanov, D. & Fasenko, I. 2017. DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and ideogram drawing. *Comparative Cytogenetics*. 11(4): 747-757.
- Legler, J., & Vogt, R.C. (2013). The turtles of Mexico: Land and freshwater forms. (1st Edition). Berkeley: University of California Press.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.
- Liehr, T. 2021. Molecular cytogenetics in the Era of chromosomics and cytogenomic approaches. *Frontiers in Genetics*. 12: 720507.
- Martis, M.M., Klemme, S., Banaei-Moghaddam, A.M., Blattner, F.R., Macas, J., Schmutzer, T., Scholz, U., Gundlach, H., Wicker, T., Simková, H., Novák, T., Neumann, P., Kubaláková, M., Bauer, E., Haseneyer, G., Fuchs, J., Doležel, J., Stein, N., Mayer, K.F.X. & Houben, A. 2012. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(33): 13343-13346.
- Mezzasalma, M., Macirella, R., Odierna, G. & Brunelli, E. 2024. Karyotype diversification and chromosome rearrangements in Squamate Reptiles. *Genes*. 15(3): 371.
- Mirzaghaderi, G. & Marzangi, K. 2015. IdeoKar: an ideogram constructing and karyotype analyzing software. *Caryologia*. 68: 31-35.
- Moon, R.G. 1974. Heteromorphism in a kinosternid turtle. *Mammalian Chromosomes Newsletter*. 15: 10-11.
- Osorio-Pérez, A., Arias-Rodriguez, L. & Hernández-Guzmán, J. 2024. La salud de los peces en la laguna urbana de Las Ilusiones, Tabasco, México. *The Biologist*. 22(2): 62430.
- Radhakrishnan, S. & Valenzuela, N. 2017. Chromosomal context affects the molecular evolution of sex-linked genes and their autosomal counterparts in turtles and other vertebrates. *Journal of Heredity*. 108(7): 720-730.
- Rovatsos, M., Praschag, P., Fritz, U. & Kratochvíl, L. 2017. Stable Cretaceous sex chromosomes enable molecular sexing in softshell turtles (Testudines: Trionychidae). *Scientific Reports*. 7: 42150.

- Sites, J.W.J., Bickham, J.W., Haiduk, M.W. & Iverson, J.B. 1979. Banded karyotypes of six taxa of kinosternid turtles. *Copeia*. 1979(4): 692-698.
- Spurbeck, J.L., Zinsmeister, A.R., Meyer, K.J. & Jalal, S.M. 1996. Dynamics of chromosome spreading. *American Journal of Medical Genetics*. 61(4): 387-393.
- Stock, A.D. 1972. Karyological relationships in turtles (Reptilia: Chelonia). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 14: 859-868.
- Valenzuela, N. 2004. Temperature-dependent sex determination. En: Deeming, D.C. (Edr.). Pp. 211-227. *Reptilian incubation: environment & behaviour*. Nottingham University Press. Nottingham, UK.
- Viana, P.F., Feldberg, E., Takagui, F.H., Menezes, S., Vogt, R.C. & Ezaz, T. 2022. Matamatas *Chelus spp.* (Testudines, Chelidae) have a remarkable evolutionary history of sex chromosomes with a long-term stable XY microchromosome system. *Scientific Reports*. 12: 6676.
- Vogt, R.C. & Bull, J.J. 1982. Temperature controlled sex-determination inn turtles: ecological and behavioral aspects. *Herpetologica*. 38(1): 156-164.
- Waters, P.D., Patel, H.R., Ruiz-Herrera, A., Álvarez-González, L., Lister, N.C., Simakov, O., Ezaz, T., Kaur, P., Frere, C., Grützner, F., Georges, A. & Graves, J.A.M. 2021. Microchromosomes are building blocks of bird, reptile, and mammal chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 118(45): e2112494118.
- Zavala, J., Greenan, R., Krantz, Q.T., DeMarini, D.M., Higuchi, M., Gilmour, M.I., White, P.A. 2017. Regulate temperature and relative humidity in air-liquid interface *in vitro* systems eliminates cytotoxicity resulting from control air exposures. *Toxicology Research*. 6(4): 448-459.

ANEXO V

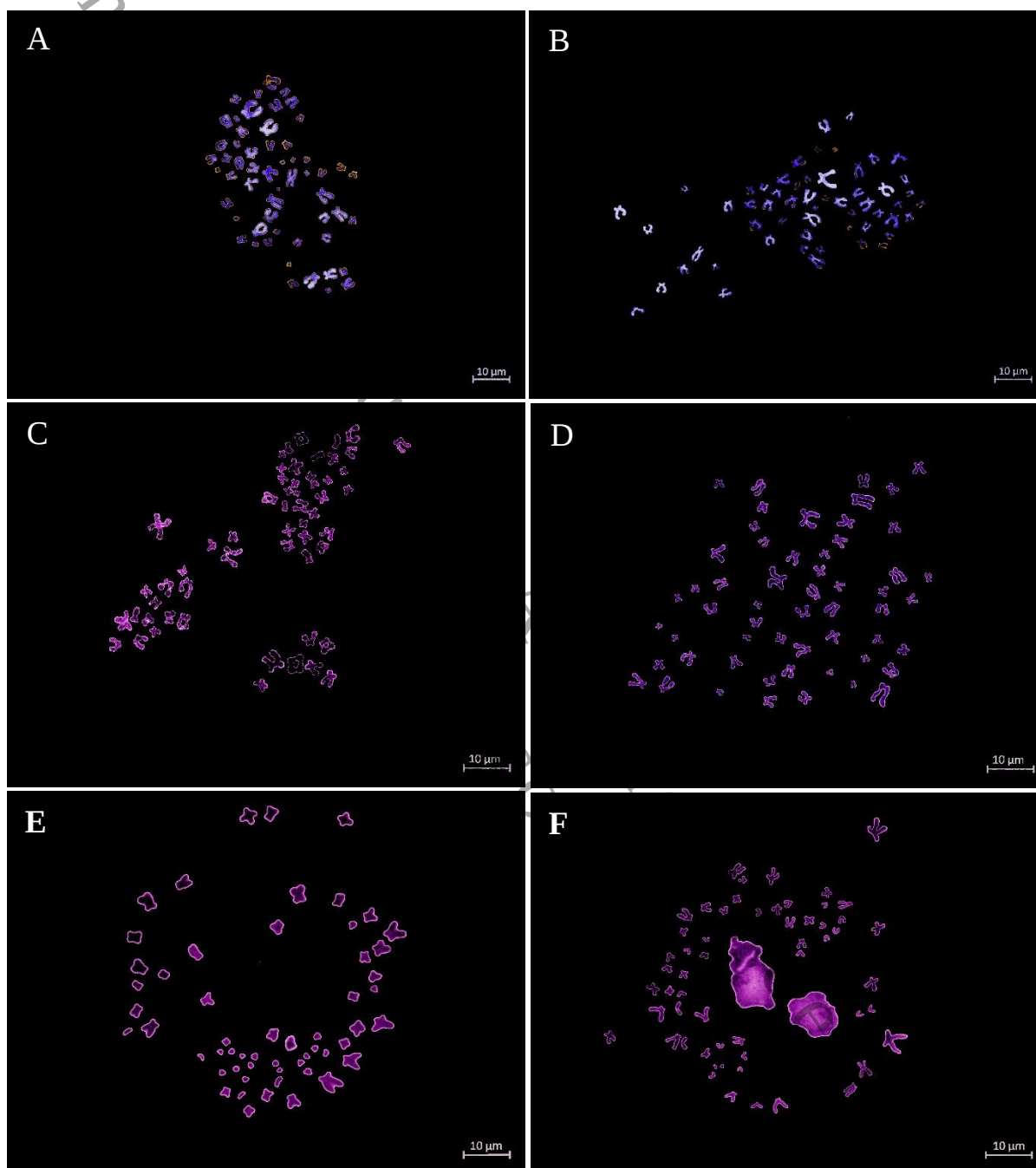


Lámina V. Dispersiones cromosómicas típicas en hembras y machos de *K. acutum* (A, B), *K. s. cruentatum* (C, D) y *K. l. leucostomum* (E, F) aplicando el método de filtro LUT del software ZEN/2011 de Carl Zeiss.

CAPÍTULO VI

6.0. CONCLUSIONES GENERALES

Se desarrolló un nuevo método novedoso de tinción, incluyendo el proceso de fijado en muestras de frotis sanguíneos con el que se podrá estudiar a las células hematopoyéticas de tortugas dulceacuícolas en diferentes campos de la biología como la citología, citometría, genética, citogenética, entre otras, obteniendo imágenes de muy buena calidad que ayudan a comprender con mayor precisión dicho material biológico. El método de tinción que se propone en este estudio reduce los costos en reactivos durante el proceso metodológico, por lo que puede ser considerada una técnica de tinción de frotis económica. Con la calidad de imagen demostrado en esta investigación se pretende beneficiar desde el punto de vista económico, así como en la calidad de posibles diagnósticos en el campo de la investigación científica en biología y veterinaria, beneficiando tanto a la sociedad civil para el cuidado de sus mascotas (tortugas y otras especies), así como a los profesionales relacionados con dichos estudios. Este nuevo método de fijado y tinción, también fue aplicado en otras investigaciones presentadas en este documento, tanto para el estudio de citometría nuclear de Feulgen para el análisis de número total de nucleótidos y el cálculo del tamaño del genoma, así como para el análisis de linfocitos durante el desarrollo de un protocolo para el cultivo celular *in vitro*, así como para la preparación de muestras para el estudio de cromosomas y composición cariotípica en las tortugas tabasqueñas.

El estudio del tamaño del genoma en las nueve especies de tortugas dulceacuícolas con distribución en el estado de Tabasco, reveló su composición genética básica, información que es inédita hasta el desarrollo del presente manuscrito. Esta nueva información se suma a una serie de esfuerzos en otros campos de la ecología y la biología molecular en tortugas tabasqueñas, que, en conjunto permitirán tener un conocimiento más amplio para el desarrollo de nuevas estrategias de conservación en el sureste mexicano y otras latitudes. Uno de los diversos datos en dicho estudio, fue la revelación del genoma en dos especies, como lo fue el caso del chiquiguo *C. rossignonii* y la tortuga taimán *C. angustatus*, determinándose que el tamaño del genoma más grande encontrado correspondió al taimán con 7.58 pg (7413.24 Mpb) y el tamaño del genoma más pequeño correspondió al chiquiguo con 4.99 pg (4880.22 Mpb). Además, se identificó variación genética entre especies y en

algunos de ellos variación genética entre poblaciones, generando hipótesis sobre el posible origen de dichas variaciones genéticas. Esto es importante para las fichas biológicas de las nueve especies de tortugas tabasqueñas y su comparación para futuros estudios a nivel poblacional en el país.

Con la necesidad de emplear un método efectivo para el cultivo *in vitro* de linfocitos para el estudio de caracteres cromosómicos y cariotípicos, se desarrolló un protocolo de cultivo celular para tortugas dulceacuícolas con distribución tropical, encontrándose que la temperatura óptima en el presente estudio fue de 28 °C, mientras que el tiempo óptimo de exposición de cultivo fue 72 h. Los resultados contrastaron con varias publicaciones y metodologías preexistentes aplicadas en tortugas dulceacuícolas e incluso marinas, donde la temperatura de cultivo varía aproximadamente a ± 2 °C, mientras que otros parámetros como el tiempo óptimo de cultivo también varió en relación de los antecedentes, donde se ha reportado hasta 96 h de cultivo. Es un claro ejemplo de la necesidad de estandarizar metodologías en especies o grupos taxonómicos específicos en relación a su área geográfica, ya que los métodos actuales no están diseñados con una finalidad universal.

Finalmente, aunque los antecedentes cromosómicos y cariotípicos habían sido previamente descritos en los años 70 para las tortugas *K. l. leucostomum* y *K. s. cruentatum*, los cromosomas y el cariotipo de *K. acutum* había permanecido en total incógnito. El actual estudio demostró que, la resolución y calidad de las imágenes de la época donde se llevaron a cabo los estudios, no permitían la correcta identificación, desde caracteres morfológico hasta caracteres morfométricos, a diferencia de lo que se puede realizar en el presente. Esta hipótesis se comprobó al demostrar, que aquellos componentes que antiguamente eran llamados microcromosomas o cromosomas tipo “C” y que no podían ser medidos y clasificados, ahora con las herramientas digitales y la evolución microscópica, se pueden analizar correctamente, llegándose a medir y clasificar con la nomenclatura clásica de Levan. Por ello, los datos que se proporcionan en esta investigación son relevantes para actualizar la clasificación cromosómica, así como la estructura de los cariotipos de las especies aquí mencionadas, recomendando que dichos estudios continúen con otras especies, donde sus antecedentes sean antiguos.

Principios bioéticos

El presente trabajo de investigación de Tesis doctoral que lleva como título “Comprendiendo el núcleo mitótico de las tortugas tropicales, nativas de Tabasco, México”, el cual fue desarrollado en la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) fue revisado y con dictamen ético de “Aprobado” (Folio 0985) por la Comisión Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la UJAT, en México.

(Se anexa Dictamen ético de CIEI-UJAT).

Para las colectas de las especies de tortugas dulceacuícolas utilizadas en la presente investigación, se obtuvo el permiso federal de colecta en territorio nacional ante la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) con número de oficio SGPA/DGVS/04315, dando cumplimiento a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, así como para aquellas especies que se encuentran en la lista de especies protegidas por la NOM-059-SEMARNAT-2010.



DICTAMEN ÉTICO

Lenin Arias Rodríguez

División Académica De Ciencias Biológicas

Presente:

En atención a su solicitud de Revisión y Dictamen Ético del

Proyecto De Investigación

Comprendiendo El Núcleo Mitótico De Las Tortugas Tropicales, Nativas De Tabasco, México

Folio 0985

Y despues de haber integrado al expediente las recomendaciones emitidas y entregadas por la

Subcomision de Biología, Química, Biotecnología Y Ciencias Agropecuarias

La CIEI resuelve lo siguiente

Aprobado

Comentarios/Recomendaciones *

Revisor 1

Proyecto muy interesante que va estudiar algunas especies de tortugas endémicas del estado de Tabasco. De acuerdo al documento el proyecto consiste en "un estudio citológico constituido por el desarrollo de una técnica hematológica nueva para el estudio de eritrocitos, un estudio cariotípico a través de cultivo in vitro de sangre periférica y aplicación de técnica de citometría para determinar el tamaño del genoma, con la finalidad de describir por primera ocasión la estructura genética de las especies de tortugas dulceacuícola de Tabasco".

En el protocolo del proyecto mencionan que cuentan con los permisos de la SEMARNAT (SGPA/DGVS/04315), documento que les indica y limita acciones a realizar para estudiar estas especies. Asi mismo, según describen en materiales y métodos, solo extraerán muestras de sangre a las tortugas para su estudio, lo demás se llevará a cabo en laboratorios.

Cabe mencionar que los permisos de la SEMARNAT tiene fecha de 13 junio 2011.

Por lo que, salvo la fecha del permiso si es que ya se hizo el estudio, el mencionado proyecto cumple satisfactoriamente con todos los requisitos necesarios y solicitado por esta comisión, y se apega a los principios éticos generales y específicos aplicables en la materia para estudiar especies animales.

Revisor 2

Se solicita adjuntar el reporte que recibió de la oficina de posgrado.



Revisor 3

Se acepta, ya que el proyecto cuenta con los permisos adecuados y se recomienda actualizarlos.

* Las recomendaciones se emiten en el entendido que será responsabilidad del investigador atenderlas.

Se extiende la presente a los 30 días del mes de enero del año 2022. Sin otro particular reciba un cordial saludo.

LAURA LOPEZ DIAZ
PRESIDENTE

c.c.p Archivo CIEI
Archivo Dirección de Investigación, UJAT
Coordinaciones de Investigación

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN,
POSGRADO Y VINCULACIÓN



CIEI | COMISIÓN INSTITUCIONAL
DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	Comprendiendo el núcleo mitótico de las tortugas tropicales, nativas de Tabasco, México
Autor(a) o autores(ras) de la Tesis:	M.C.A. Javier Hernández Guzmán
ORCID:	https://orcid.org/0000-0002-8001-5178
Resumen de la Tesis:	El estado de Tabasco cuenta con nueve especies de tortugas dulceacuícolas. En los últimos años los estudios más frecuentes son los de espacio-temporal y microorganismos asociados a quelonios; mientras que los estudios de genética básica y molecular son insuficientes en el grupo de los testudines. En Tabasco solo se cuenta con un estudio de citogenética en <i>Kinosternon leucostomum leucostomum</i>, <i>Staurotypus triporcatus</i> y <i>Trachemys venusta venusta</i>, por lo que se desconoce totalmente la estructura citológica y genética de las seis especies restantes: <i>Kinosternon acutum</i>, <i>K. scorpioides cruentatum</i>, <i>Claudius angustatus</i>, <i>Chelydra rossignonii</i>, <i>Rhinoclemmys areolata</i> y <i>Dermatemys mawii</i>. Por ello, se realizó un estudio citológico constituido por el desarrollo de una

	técnica hematológica nueva para el estudio de eritrocitos, un estudio cariotípico a través de cultivo <i>in vitro</i> de sangre periférica y aplicación de técnica de citometría para determinar el tamaño del genoma, con la finalidad de describir por primera ocasión la estructura genética de las especies de tortugas dulceacuícola de Tabasco; además de generar información inédita en las especies y fomentar una mejor descripción en sus fichas biológicas existentes, desde el punto de vista individual como especie o como poblaciones con fines de conservación, y de aclaración de controversias taxonómicas.
Palabras claves de la Tesis:	Citología, células, hematología, genética, citogenética, cromosomas, citometría, tamaño del genoma, tortugas dulceacuícolas, Tabasco.
Referencias citadas:	Arias-Rodriguez, L. (2019). Resumen ejecutivo. Diversidad genética. En: La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado. Vol. II. (pp. 389-390). CONABIO, México. Arias-Rodriguez, L., Álvarez-González, C.A., Indy, J.R., Lagunes-Espinoza, L.C., Páramo-Delgadillo, S., Burelo-Ramos, C.M., Ruiz-Carrera, V., Gómez-Cruz, R. y del Rivero-Bautista, N. (2019a). Perspectivas de los estudios de genética y biotecnología en las especies nativas. Diversidad genética. En: La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado. Vol. II. (pp. 391-398). CONABIO, México.

	Arias-Rodriguez, L., Indy, J.R., Páramo-Delgadillo, S. y Álvarez-González, C.A. (2019b). Avances en el conocimiento genético de la biodiversidad. Diversidad genética. En: La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado. Vol. II. (pp. 399-404). CONABIO, México. Ballard, B. y Cheek, R. (2017). Exotic animal medicine for the veterinary technician. Third Edition. Wiley Blackwell. Iowa, USA. 516 p. Barragán-Vázquez, M.R., Ríos-Rodas, L., Fucsko, L.A., Porras, L.W., Mata-Silva, V., Rocha, A., DeSantis, D.L., García-Padilla, E., Johnson, J.D. y Wilson, L.D. (2022). The herpetofauna of Tabasco, Mexico: composition, distribution, and conservation status. Amphiban & Reptile Conservation 16(2): 1-61. Berry, J.F., Seidel, M.E. y Iverson, J.B. (1997). A new species of mud turtle (Genus <i>Kinosternon</i>) from Jalisco and Colima, Mexico, with notes in its natural history. Chelonian Conservation and Biology. 2: 329-337. Buchanan, S.W., Buffum, B. y Karraker, N.E. (2017). Responses of a spotted turtle (<i>Clemmys guttata</i>) population to creation of early-successional habitat. Herpetological Conservation and Biology. 12: 688-700. Campbell, T.W. (2015). Exotic animal hematology and cytology. Fourth Edition. Wiley Blackwell. Iowa, USA. 402 p.
--	--

	Carr, J.L., Bickham, J.W. y Dean, R.H. (1981). The karyotype and chromosomal banding patterns of the Central American river turtle <i>Dermatemys mawii</i>. <i>Herpetologica</i>. 37: 92-95. Cueto-Mares, M.A., Castañeda-Gaytán, G., Becerra, E. y Rubio-Rincón, A. (2017). Ecología espacial y direccionalidad de hembras de <i>Terrapene Coahuila</i> en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. <i>Revista Mexicana de Biodiversidad</i>. 88: 860-866. https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.034 Donato-Rondón, J.C., González-Trujillo, J.D., Romero, B. y Castro-Rebolledo, M.I. (2018). Diatom assemblages associated with turtle carapaces in the Neotropical region. <i>Revista de Biología Tropical</i>. 66: 1362-1372. https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.31396 Ernst, C.H., y Barbour, R.W. (1989). <i>Turtles of the world</i> (1st Edition). Washington: Smithsonian Institution Press. Farkas, B., Ziegler, T., Pham, C.T., Ong, A.V. y Fritz, U. (2019). A new species of <i>Pelodiscus</i> from northeastern Indochina (Testudines, Trionychidae). <i>Zookeys</i>. 824: 71-86. https://doi.org/10.3897/zookeys.824.31376 Flores-Villela, O. y García-Vázquez, U.O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. <i>Revista Mexicana de Biodiversidad</i>. 85: 467-475. https://doi.org/10.7550/rmb.43236
--	--

	Fujiwara, A., Nishida-Umehara, C., Sakamoto, T., Okamoto, N., Nakayama, I. y Abe, S. (2017). Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. <i>Genetica</i>. 111: 77-89. https://doi.org/10.1023/A:1013788626712 Galarza-Hernández, L. (2017). Efectos del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre la sobrevivencia y las células sanguíneas de juveniles de la tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>. [Tesis de Licenciatura en Biología]. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 45 p. Gallardo-Alvárez, M.I., Lesher-Gordillo, J.M., Machkour-M'Rabet, S., Zenteno-Ruiz, C.E., Olivera-Gómez, L.D., Barragán-Vázquez, M.R., Ríos-Rodas, L., Valdés-Marín, A., Vázquez-López, H.G. y Arriaga-Weiss, S.L. (2019). Genetic diversity and population structure of founders from wildlife conservation management units and wild populations of critically endangered <i>Dermatemys mawii</i>. <i>Global Ecology and Conservation</i>. 19: e00616. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00616 García-De la Peña, C., Rojas-Domínguez, M., Ramírez-Bautista, A., Vaca-Paniagua, F., Díaz-Velázquez, C., Ávila-Rodríguez, V., Valenzuela-Núñez, L.M. y Meza-Herrera, C.A. (2019). Microbiota bacteriana oral de la tortuga del bolsón <i>Gopherus flavomarginatus</i> en la
--	--

	Reserva de la Biósfera Mapimí, México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 90: 1-14. https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2683 Hernández-Guzmán, J. (2018). Caracterización cromosómica de las tortugas <i>Kinosternon leucostomum</i>, <i>Staurotypus triporcatus</i> y <i>Trachemys scripta</i> nativas de Tabasco, México. [Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales]. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. 52 p. Hernández-Guzmán, J., Indy, J.R., Yasui, G.S. y Arias-Rodriguez, L. (2014). Los cromosomas de las tortugas tropicales: <i>Kinosternon leucostomum</i>, <i>Staurotypus triporcatus</i> (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). Revista de Biología tropical. 62: 671-688. https://doi.org/10.15517/rbt.v62i2.10843 Howell, H.J. y Seigel, R.A. (2019). The effects of road mortality on small, isolated turtle populations. Journal of Herpetology. 53: 39-46. https://doi.org/10.1670/18-022 Jenkins-Perez J. (2012). Hematologic evaluation of reptiles: A diagnostic mainstay. Veterinary Technician. 33(8): 1-8. Kligerman, A.D. y Bloom, S.E. (1977). Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. Journal of the Fisheries Research Board
--	--

	of Canada. 34: 266-269. https://doi.org/10.1139/f77-039 Lee, J.G. (2000). A field guide to the amphibians and reptiles of the Maya world: The lowlands of Mexico, northern Guatemala and Belize. Cornell University Press. 402 p. Legler, J. y Vogt, R.C. (2013). The turtles of Mexico: Land and freshwater forms. (1st Edition). Berkeley: University of California Press. Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas. 52: 201-220. https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x López-Hernández, J.C. (2017). Biología, fisiología espermática básica y efecto de la radiación ultravioleta sobre la fisiología e integridad de las células espermáticas del bagre tropical <i>Rhamdia laticauda</i>. [Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales]. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 136 p. López-Luna, M.A., Cupul-Magaña, F.G., Escobedo-Galván, A.H., González-Hernández, A.J., Centenero-Alcalá, E., Rangel-Mendoza, J.A., Ramírez-Ramírez, M.M. y Cazares-Hernández, E. (2018). A distinctive new species of mud turtle from western Mexico. Chelonian Conservation and Biology. 17: 2-13.
--	---

	López-Luna, M.A., Venegas-Anaya, M., Cupul-Magaña, F.G., Rangel-Mendoza, J.A. y Escobedo-Galván, A.H. (2021). Mitochondrial DNA data support the recognition fo the mud turtle, <i>Kinosternon vogti</i> (Cryptodira: Kinosternidae). <i>Chelonian Conservation and Biology</i>. 20(1): 97-102. https://doi.org/10.2744/CCB-1387.1 Majtánová, Z., Symonová, R., Arias-Rodriguez, L., Sallan, L. y Ráb, P. (2017). “Holostei versus Halecostomi” Problem: Insight from cytogenetics of ancient nonteleost actinopteryian fish, bowfin <i>Amia calva</i>. <i>Journal of Experimental Zoology</i>. 620-628. https://doi.org/10.1002/jez.b.22720 Maslin, A-S., Chen, P.N, Coutinho, M.E., Drummond, G.M., Gallego-Garcia, N., Guntoro, J., Hofmeyr, M.D., Iverson, J.B., Kiester, A.R., Lewis, R.E., McCormack, T., Mifsud, D., Páez, V.P., Palomo-Ramos, R., Platt, K., Platt, S., Ríos-Arana, J., Saumure, R., Schleicher, A., Schoppe, S., Som, S., Terry, A. y Vogt, R.C. (2018). <i>TURTLES IN TROUBLE: The World's 25+ Most Endangered Tortoises and Freshwater Turtles-2018</i>. Eds: Craig B.S., Rhodin, A.G.J., van Dijk, P.P., Horne, B.D., Blanck, T., Goode, E.V., Hudson, R., Mittermeier, R.A., Currylow, A., Eisemberg, C., Frankel, M., Georges, A., Gibbons, P.M.,
--	---

	Juvik, J.O., Kuchling, G., Luiselli, L., Haitao, S., Singh, S. y Walde, A. Turtle Conservation Coalition IUCN SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group, Turtle Conservancy, Turtle Survival Alliance, Turtle Conservation Fund, Conservation International, Chelonian Research Foundation, Wildlife Conservation Society, and Global Wildlife Conservation. OJAI, California, United States of America. 79 p. Mazzoleni, S., Augstenová, B., Clemente, L., Auer, M., Fritz, U., Praschag, P., Protiva, T., Valenský, P., Kratochvíl, L. y Rovatsos, M. (2019). Turtles of the genera <i>Geoemyda</i> and <i>Pangshura</i> (Testudines: Geoemydidae) lack differentiated sex chromosomes: the end of a 40 year error cascade for <i>Pangshura</i>. PeerJ. 1-15. https://doi.org/10.7717/peerj.6241 Méndez, D., Cuevas, E., Navarro, J., González-Garza, B.I. y Guzmán-Hernández, V. (2013). Rastreo satelital de las hembras de tortuga blanca <i>Chelonia mydas</i> y evaluación de sus ámbitos hogareños en la costa norte de la Península de Yucatán, México. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 48: 497-509. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572013000300008 Mirzaghaderi, G. y Marzangi, K. (2015). IdeoKar: an ideogram constructing and karyotype analyzing
--	---

	software. <i>Caryologia</i>. 68: 31-35. https://doi.org/10.1080/00087114.2014.998526 Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 1-77 p. Osorio-Pérez, A. (2017). Fisiología y microestructura espermática del pejelagarto tropical <i>Atractosteus tropicus</i>. [Tesis de Licenciatura en Biología]. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 62 p. Poulakakis, N., Edwards, D.L., Chiari, Y., Garrick, R.C., Russello, M.A., Benavides, E., Watkins-Colwell, G.J., Glaberman, S., Tapia, W., Gibbs, J.P., Cayot, L.J. y Caccone, A. (2015). of a new Galapagos Giant tortoise Description species (<i>Chelonoidis</i>; Testudines: Testudinidae) from Cerro Fatal on Santa Cruz Island. Public Library of Science One. 10: 1-18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138779 Quiroz-Herrera, V.H. y Palacio-Baena, J. (2017). Niveles sanguíneos de biomarcadores de daño genético en eritrocitos de <i>Lepidochelys olivacea</i> (Cheloniidae) en Colombia. <i>Acta Biológica Colombiana</i>. 22: 322-230.
--	--

	https://doi.org/10.15446/abc.v22n3.58688 Recino-Reyes, E.B., Leshner-Gordillo, J.M., Machkour-M'Rabet, S., Gallardo-Alvarez, M.I., Zenteno-Ruiz, C.E., Olivera-Gómez, L.D., Valdés-Marín, A., Gómez-Carrasco, G., Ríos-Rodas, L., Barragán-Vázquez, M.R. y Hernández-Martínez, R. (2020). Conservation and management of <i>Trachemys venusta venusta</i> in Southern Mexico: a genetic approach. <i>Tropical Conservation Science</i>. 13: 1-20. https://doi.org/10.1177/1940082920961506 Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., Bour, R., Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H.B., y van Dijk, P.P. (2021). Turtles of the world. Annotated checklist and Atlas of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. <i>Chelonian Research Monographs</i>, 8, 1-472. Rodríguez-Correa, H., González-Rodríguez, A. y Oyama, K. (2017). Perspectivas de la ecología molecular en un país megadiverso. <i>Revista Mexicana de Biodiversidad</i>. 88: 3-13. https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.002 Silva-Brito, E., Vogt, R.C., Valadão, R.M., Fernandes-França, L., Penha, J. y Strüssmann, C. (2018). Population ecology of the freshwater turtle <i>Messoclemmys vanderhaegei</i> (Testudines: Chelidae). <i>Herpetological Conservation and Biology</i>. 13: 355-365. Smith, H.M. y Smith, R.B. (1979). Synopsis of the
--	---

	Herpetofauna of Mexico: Guide to Mexican turtles: Bibliographic addendum III, Volume VI (1st Edition). Coopersburg: John Johnson. Soria-Guzmán, L.F. (2016). Determinación e inventario de tortugas del género <i>Trachemys</i> (Emydidae) del Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala UNAM y elaboración de una clave dicotómica. [Tesis de Licenciatura]. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. 50 p. Thomas, T.M., Granatosky, M.C., Bourque, J.R., Krysko, K.L., Moler, P.E., Gamble, T., Suarez, E., Leone, E., Enge, K.M. y Roman, J. (2014). Taxonomic assessment of alligator snapping turtles (Chelydridae: <i>Machrochelys</i>), with the description of two new species from the southeastern United States. <i>Zootaxa</i>. 3786: 141-165. https://doi.org/10.11646/zootaxa.3786.2.4 Valdez-Villavicencio, J.H., Peralta-García, A. y Guillen-González, J.A. (2016). Nueva población de la tortuga de poza del suroeste <i>Emys pallida</i> en el desierto central de Baja California, México. <i>Revista Mexicana de Biodiversidad</i>. 87: 264-266. https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.10.004 Van Dijk, P.P., Iverson, J.B., Rhodin, A.G.J., Shaffer, H.B. y Bour, R. (2014). <i>Turtles of the world</i>,
--	--

	7the edition: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation status. Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises. Chelonian Research Monographs. 5: 329-479. Zenteno-Ruíz, C.E., Barba-Macías, E., Bello-Gutiérrez, J. y Ochoa-Gaona, S. (2010). Caracterización espacio-temporal del hábitat y presencia de <i>Dermatemys mawii</i> (Testudines: Dermatemydidae) en la cuenca de Grijalva-Usumacinta, Tabasco, México. Revista de Biología Tropical. 58: 1247-1260. https://doi.org/10.15517/rbt.v58i4.5409
--	--