

DESCRIPCIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN CONDICIONES DE
CAUTIVERIO DE LA TORTUGA HICOTEA *Trachemys callirostris callirostris* (Testudinata:
Emydidae) EN EL PARQUE RECREATIVO Y ZOOLOGICO PISCILAGO (GIRARDOT,
COLOMBIA)

PRESENTADO POR
Andrés Fernando Quintero Gavilán

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD CIENCIAS
CARRERA BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C
DICIEMBRE
2010

DESCRIPCIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN CONDICIONES DE
CAUTIVERIO DE LA TORTUGA HICOTEA *Trachemys callirostris callirostris* (Testudinata:
Emydidae) EN EL PARQUE RECREATIVO Y ZOOLOGICO PISCILAGO (GIRARDOT,
COLOMBIA)

PRESENTADO POR
Andrés Fernando Quintero Gavilán

INGRID SCHULER

Decana Académica

ANDREA FORERO

Directora Carrera de Biología

DESCRIPCIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN CONDICIONES DE
CAUTIVERIO DE LA TORTUGA HICOTEA *Trachemys callirostris callirostris* (Testudinata:
Emydidae) EN EL PARQUE RECREATIVO Y ZOOLOGICO PISCILAGO (GIRARDOT,
COLOMBIA)

PRESENTADO POR
Andrés Fernando Quintero Gavilán

EDILMA GUEVARA ROZO MSc

Directora

EDGAR RAÚL CUBILLOS MSc

Jurado

Nota de advertencia

Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado".

Agradecimientos

De manera muy especial, agradezco a la Doctora Edilma Guevara, directora de esta investigación y del Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Javeriana, por permitirme realizar este trabajo, además de su constante apoyo, ayuda, tiempo y preparación para concluir esta investigación.

Raúl Cubillos, profesor de Biología del desarrollo y pre médico de la Pontificia Universidad Javeriana, por haber aceptado ser mi jurado, la colaboración prestada, el conocimiento impartido y por sus valiosos aportes científicos para la realización de este trabajo.

Al Parque Recreativo y Zoológico Piscilago, por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones. Al grupo de cuidadores e intérpretes ambientales por su colaboración y compañía, especialmente a José, Luis, Manuel, Rigoberto, Sandro, Oswaldo por su ayuda y esfuerzo en campo. A la bióloga Liz Díaz por sus ideas, aportes y colaboración.

A mi familia, por su colaboración y ayuda incondicional durante la elaboración de este trabajo.

Finalmente doy gracias a Catalina Durán, Angélica Rodríguez y a todas aquellas personas que de una u otra forma me colaboraron en la elaboración de este trabajo.

Tabla de contenidos

	Pág
1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	8
3. Planteamiento del problema.....	10
3.1. Problema científico.....	10
3.2. Justificación.....	10
4. Pregunta de investigación.....	13
5. Marco teórico o referentes conceptuales.....	14
5.1. Definición de tablas de desarrollo.....	14
5.2. Definición de la técnica histológica.....	17
6. Antecedentes.....	19
6.1. Generalidades de la subespecie.....	19
6.1.1. Ubicación taxonómica.....	19
6.1.2. Identificación de la subespecie.....	19
6.1.3. Distribución geográfica.....	20
6.1.4. Hábitad y aspectos de historia natural.....	20
6.1.5. Dimorfismo sexual.....	20
6.1.6. Reproducción.....	21
6.1.7. Desarrollo embrionario.....	22
6.1.7.1. Segmentación y blastulación.....	22
6.1.7.2. Gastrulación.....	24
6.1.7.3. Neurulación.....	26
6.1.7.4. Membranas extraembrionarias.....	27
6.1.7.4.1. Amnios y corion.....	27
6.1.7.4.2. Alantoides.....	28
6.1.7.4.3. Vesícula umbilical y alantocorion.....	28
6.1.8. Importancia socio económica.....	29
6.2. Trabajos realizados a nivel embrionario.....	29
7. Objetivos.....	30
7.1. General.....	30
7.2. Específicos.....	30
8. Metodología.....	30
8.1. Área de estudio.....	30
8.2. Procedimientos en el sitio de muestreo.....	31
8.3. Procedimientos de laboratorio.....	32
9. Resultados.....	34
10. Discusión.....	54
11. Conclusiones.....	58
12. Recomendaciones.....	59
13. Bibliografía citada.....	60

1. Resumen

En este trabajo se realizó la descripción macroscópica e histológica de los embriones de la tortuga Hicotea (*Trachemys callirostris callirostris*) subespecie endémica para Colombia, con el objetivo de elaborar la tabla de desarrollo de fases normales para esta subespecie. La elaboración de la tabla se realizó a una temperatura constante de 30°C. Estableciéndose un total de XVI estadios, de los cuales los primeros 7 fueron descritos macroscópica e histológicamente esta ultima descripción se realizó por medio de cortes transversales seriados empleando la técnica de hematoxilina-eosina, a partir del estadio 8 hasta el 16 se describieron macroscópicamente. Los estadios se describieron a partir de 7 ovoposiciones logradas naturalmente, con un total de 96 huevos y realizando 4 repeticiones por cada estadio para determinar el tiempo de desarrollo total y de cada estadio. El tiempo total de desarrollo desde la ovoposición hasta la eclosión para *Trachemys callirostris callirostris*, fue de 1401.75 horas equivalente a 58.4 días.

2. Introducción

A lo largo de la historia de la biología del desarrollo se han empleado los reptiles para el estudio y realización de experimentos a nivel embrionario debido a que sus características de desarrollo posibilitan la observación y manipulación de los embriones, ya que por su tamaño, el crecimiento puede seguirse fácilmente usando prácticas simples de laboratorio, lo que permite la elaboración de las tablas de desarrollo embrionario (Wise *et al.*, 2009). Estas tablas se pueden realizar a nivel macroscópico e histológico para establecer de forma clara las diferentes etapas o estadios, indicando el grado de madurez alcanzado por un embrión durante las fases más tempranas de su desarrollo (Balinsky & Fabian, 1983). La tortuga Hicotea (*Trachemys callirostris callirostris*) es una subespecie endémica para Colombia pero poco se conoce de su biología y ecología reproductiva; actualmente la tortuga tiene una importancia económica, social y cultural (MAVDT-UNAL, 2009), por lo cual es necesario realizar estudios e investigaciones en estas áreas (Castaño-Mora & Medem, 2002), que permitan plantear estrategias para la persistencia a largo plazo de la subespecie (MAVDT-UNAL, 2009).

Esta subespecie soporta una mortalidad muy alta desde los estadios iniciales de su desarrollo y a lo largo de su vida hasta convertirse en adulto debido a que comercialmente el huevo es empleado como alimento, son usadas como mascotas en el estadio de neonato y en la etapa de adulto son cazadas para el consumo de su carne (De La Ossa & Riaño, 1999). La Hicotea fue considerada en el pasado como el quelonio más común en su área de distribución pero debido a la intensa explotación de huevos y tortugas adultas, su consecución no es tan frecuente (De La Ossa & Riaño, 1999), ya que es una fuente de proteína muy importante para la población (Castaño-Mora & Medem, 2002).

Actualmente la subespecie se encuentra sometida a diferentes causas naturales que disminuyen su población, incrementando su mortalidad en todas las etapas de su vida (huevo, neonato y adulto) como lo son las variaciones en la temperatura ambiental, el aumento de los niveles de agua en los ríos y los depredadores (MAVDT-UNAL, 2009). Estas causas naturales combinadas con la captura excesiva efectuada por el hombre con fines comerciales son factores decisivos de su disminución. Hoy en día la explotación ilimitada de la Hicotea ha hecho que sea declarada, según las categorías de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN), en casi amenaza como lo afirma Castaño-Mora & Medem (2002). La gran mayoría de los ejemplares de esta subespecie se encuentran distribuidos en áreas donde la población habitante es de bajos recursos, lo que

hace que la comercialización de neonatos, huevos y carne de los adultos sea más común (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007); estos factores reflejan los efectos negativos sobre la dinámica poblacional y la ecología reproductiva de la subespecie (MAVDT-UNAL, 2009).

Lo anterior conlleva a la necesidad de aportar y desarrollar ideas en pro de preservar la subespecie en todas las etapas de su vida; una forma de contribuir al conocimiento del desarrollo embrionario de la Hicotea es realizando una tabla de desarrollo que permite determinar y describir los diferentes estadios a partir de un sistema estándar para el estudio de embriones en vertebrados propuesto por Werneburg (2009). Es importante resaltar que no se había elaborado la tabla de desarrollo para la Hicotea, por lo que resulta pertinente con esta investigación en estudios posteriores reconocer el estadio con las condiciones de temperatura y humedad adecuadas, para el traslado de los huevos a nidos artificiales (De La Ossa & Riaño, 1999), con el fin de aumentar y fomentar la cría artificial en zoo criaderos, contribuyendo al rendimiento de la población de esta subespecie y así garantizar su existencia futura, reduciendo la mortalidad desde la etapa de huevo y neonato (Wise *et al.*, 2009), lo cual está relacionado con los propósitos de preservación y conservación planteados por las diferentes entidades gubernamentales, entidades educativas y organizaciones ambientales. Este estudio tuvo por objeto la elaboración de la tabla de desarrollo embrionario de esta subespecie, describiendo los cambios macroscópicos e histológicos que suceden en cada etapa embrionaria, además de registró el tiempo de cada uno de los estadios y así se conoció el tiempo total de desarrollo embrionario.

3. Planteamiento del problema

3.1. Problema científico

La tortuga Hicotea (*Trachemys callirostris callirostris*) soporta una mortalidad muy alta desde los estadios iniciales de su desarrollo y a lo largo de su vida hasta convertirse en adulto, ya que comercialmente el huevo es empleado como alimento, son usadas como mascotas en el estadio de neonato y en la etapa de adulto son cazadas para el consumo de su carne (De La Ossa & Riaño, 1999). Debido a esta mortalidad, la tortuga tiene una importancia económica, social y cultural (MAVDT-UNAL, 2009). La Hicotea es una subespecie endémica para Colombia pero poco se conoce de su biología y ecología reproductiva por lo cual es necesario realizar estudios e investigaciones en estas áreas (Castaño-Mora & Medem, 2002) las cuales permiten plantear estrategias que garanticen la persistencia a largo plazo de la subespecie (MAVDT-UNAL, 2009). Una forma de contribuir a este tipo de estudios es realizando tablas de desarrollo embrionario, las cuales permiten determinar y describir los diferentes estadios o etapas del desarrollo embrionario a partir un sistema estándar para el estudio de embriones en vertebrados propuesto por Werneburg (2009); estas tablas se pueden realizar a nivel macroscópico e histológico para comparar e indicar el grado de madurez del embrión (Balinsky & Fabian, 1983). Es importante resaltar que no se ha elaborado la tabla de desarrollo para esta subespecie de tortuga, siendo pertinente desarrollar una investigación al respecto con la cual se podrá en investigaciones posteriores reconocer el estadio y las condiciones de temperatura y humedad adecuadas para el traslado de los huevos a nidos artificiales (De La Ossa & Riaño, 1999), y de esta manera aumentar y fomentar la cría artificial en zoo criaderos, disminuyendo la mortalidad de la subespecie.

3.2. Justificación

Los reptiles se han empleado para el estudio y la realización de experimentos a nivel embrionario ya que sus características de desarrollo permiten la observación, manipulación y descripción de los embriones (Wise *et al.*, 2009). La tortuga Hicotea ha constituido desde las culturas precolombinas hasta nuestros días un recurso proveedor de alimento para las comunidades que han estado asentadas en su área de distribución geográfica (MAVDT-UNAL, 2009). La Hicotea fue considerada en el pasado como el quelonio más común en su área de distribución pero debido a la intensa explotación de huevos y tortugas adultas de la que ha sido objeto su consecución ya no es tan frecuente (De La Ossa & Riaño, 1999), debido a que es una fuente de proteína muy importante para la población, además es uno de los animales que puede convertir productos vegetales en alimento proteínico (carne y

huevos), los cuales son utilizados para el consumo humano (Castaño-Mora & Medem, 2002).

Actualmente la subespecie se encuentra sometida a diferentes causas naturales que disminuyen su población, incrementando su mortalidad en todas las etapas de su vida (huevo, neonato y adulto) como lo son las variaciones en la temperatura ambiental, el aumento de los niveles de agua en los ríos, y los depredadores (MAVDT-UNAL, 2009).

Con respecto a la temperatura ambiental esta ha aumentado debido a la acumulación de gases en la atmosfera tales como: el vapor de agua, el dióxido de carbono, el ozono y el metano; debido a esta acumulación excesiva de gases se produce el efecto invernadero lo cual conlleva a el cambio climático (CDB, 2007); estas fluctuaciones en la temperatura están afectando la supervivencia de los embriones y la proporción de sexos en las tortugas. Los tortuguillos requieren un rango óptimo de temperatura para su desarrollo (De La Ossa & Riaño, 1999), esta temperatura al variarse reduce la cantidad de machos por nidada y aumenta el número de hembras, lo cual implica una disminución en las probabilidades de reproducción en la etapa adulta (CDB, 2007).

La supervivencia de huevos y neonatos es baja debido a factores como cambios fuertes en la temperatura de incubación, inundación del nido, infertilidad y en mayor proporción la depredación (De La Ossa & Riaño, 1999). Varios vertebrados han sido reportados como depredadores de huevos tales como los lagartos (*Ameiva sp.* y *Tupinambis teguixin*), algunos mamíferos como zorras (*Cerdocyon thous*, *Procyon sp.* y *Didelphis marsupiales*), y algunas aves carroñeras (*Coragyps atratus* y *Milvago chimachima*). Ha sido reportada también la depredación por algunos invertebrados como las hormigas, algunos coleópteros y moscas, que son atraídos por los olores producidos al momento de la postura y eclosión (De La Ossa & Riaño, 1999). Otros daños que sufren los nidos son causados por el pisoteo del ganado bovino de las fincas ganaderas que utilizan las orillas del rio y las ciénagas como fuente de agua en época de sequía (MAVDT-UNAL, 2009).

Adicionalmente los neonatos y juveniles son consumidos por aves carroñeras como el golero (*Coragyps atratus*), pigua (*Milvago chimachima*), las cuales eliminan alrededor del 5% de los recién nacidos que alcanzan la superficie de la arena. Otros consumidores son los peces carnívoros como el comelos (*Leporinus myscarum*) y moncholo (*Hoplias malbaricus*), el lobo pollero (*Tupinambis teguixin*) y la zorra baya (*Cerdocyon thous*), así

como babillas (*Caiman crocodilus*). Por su parte, los adultos son depredados por el tigre (*Panthera onca*), el tigrillo (*Felis pardalis*) y el caimán (*Crocodylus acutus*). (Medem, 1975; MAVDT-UNAL, 2009).

Las tasas de eclosión en los nidos es muy baja; Medem (1975) reporto un 30% de eclosión del total de nidos naturales examinados. En la población de la depresión Momposina estudiada por Restrepo *et al.* (2007) poco menos del 50% de los 55 nidos estudiados fueron depredados completamente por cerdos y lagartijas, en 7 de ellos no hubo eclosión, 16 con eclosión parcial de huevos, mientras que solo el 10% eclosionaron completamente. Para un sitio en particular dentro de esta región se obtuvo una tasa de eclosión de 13.4% en nidos naturales, mientras un 60% en nidos previamente protegidos (Bernal *et al.*, 2004; Restrepo *et al.*, 2007; MAVDT-UNAL, 2009).

Estas causas naturales combinadas con la captura excesiva efectuada por el hombre con fines comerciales son los factores decisivos de su disminución; hoy en día la explotación ilimitada de la Hicotea ha hecho que sea considerada “escaza” en las zonas de su distribución geográfica, siendo declarada según las categorías Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN) en casi amenaza como lo afirma Castaño-Mora & Medem (2002), la gran mayoría de los ejemplares de esta subespecie se encuentran distribuidas en áreas donde la población habitante es de bajos recursos, por esta razón la comercialización de neonatos, huevos y carne de los adultos se hace más común (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

Estos factores reflejan los efectos negativos sobre la dinámica poblacional y la ecología reproductiva de la subespecie (MAVDT-UNAL, 2009), haciendo necesario promover la cría artificial de la Hicotea en zoo criaderos, lo cual permitiría lograr un aumento en su población; para esto se debe en estudios posteriores precisar las medidas de manejo necesarias para el traslado de los embriones a condiciones controladas de temperatura y humedad en función de la etapa de desarrollo embriológico, este estadio o etapa será obtenida de la tabla de desarrollo aportada por este estudio. Lo anterior contribuye al rendimiento de la población de esta subespecie y así garantizar su existencia futura, reduciendo la mortalidad desde el inicio de su desarrollo (Wise *et al.*, 2009).

La importancia de la subespecie no es solo a nivel ecológico también lo es a nivel socio económico, ya que es uno de los animales más propensos a ser utilizados como proveedor

de carne y huevos (De La Ossa & Riaño, 1999). La época del año en la cual se extraen ejemplares de la Hicotea y se comercializan en mayor cantidad es en los días próximos a la semana santa, en estos días los vendedores obtienen entre \$200.000 y \$300.000 al día por la venta de 86 ejemplares en promedio. Los vendedores comentan que en la temporada de diciembre a abril pueden vender entre \$40.000 y \$60.000 diarios en Hicoteas, es decir cerca de \$2'000.000, mensuales durante esta temporada por lo cual es una actividad rentable para ellos (MAVDT-UNAL, 2009).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado el Ministerio de Medio Ambiente (2002) creó el programa nacional para la conservación de las tortugas marinas y continentales de Colombia, con el objetivo de garantizar la supervivencia de todas las especies de tortugas presentes en nuestro país además de la creación de áreas para la protección y preservación de estas especies. Una de las áreas creadas en pro de la conservación de esta subespecie en Colombia, es el acuario del Parque Recreativo y Zoológico Piscilago que se encuentra ubicado en el kilómetro 105 vía Bogotá – Girardot, el cual cuenta con ejemplares de tortuga Hicotea en cautiverio, siendo un gran soporte genético con el que se cuenta para preservar la especie. Además el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial en colaboración con la Universidad Nacional de Colombia afirman que es necesario plantear estrategias que permitan la persistencia a largo plazo las poblaciones de la tortuga Hicotea y así contribuir a la recuperación de sus hábitats (MAVDT-UNAL, 2009).

Lo anteriormente expuesto genera la necesidad de aportar y desarrollar ideas las cuales están en pro de preservar la subespecie en todas las etapas de su vida. Este estudio tiene por objeto elaborar la tabla de desarrollo de esta subespecie, la cual se utilizara en estudios posteriores para fomentar la zootecnia de tortuguillos en condiciones controladas (humedad, temperatura y depredadores) y así disminuir el impacto en al menos dos etapas del ciclo de vida de la tortuga (huevo y neonato), lo cual está relacionado con los propósitos de preservación y conservación planteados por las diferentes entidades gubernamentales, entidades educativas y organizaciones ambientales.

4. Pregunta de investigación

¿Cuáles son los estadios del desarrollo embrionario de la tortuga Hicotea *Trachemys callirostris callirostris* en condiciones de cautiverio en el Parque recreativo y zoológico Piscilago?

5. Marco teórico o referentes conceptuales

5.1. Definición de tablas de desarrollo

El desarrollo embrionario de un organismo se inicia a partir del cigoto mediante una serie de procesos biológicos que implican la segmentación o clivación, blastulación, gastrulación, neurulación, crecimiento y diferenciación celular e histológica lo cual genera una gran variedad de estructuras con funciones especializadas (Balinsky & Fabian, 1983).

Es importante tener en cuenta que dichos procesos se originan por una serie de cambios biológicos, físicos y químicos (Sadler, 2007) y para identificar las fases de ellos se debe partir de las características propias de cada uno, por ejemplo; en la clivación el número y tamaño de los blastómeros, durante la gastrulación la formación de las capas germinativas y los movimientos morfogenéticos, en la fase de neurula la formación de la placa, pliegue y tubo neural, finalmente durante la organogénesis se utiliza el número de somitas (Guevara, 1982), las cuales hacen su diferenciación en esclerotoma, dermatoma y miotoma; estas aparecen de forma secuencial, con respecto a las somitas anteriores dando origen a las vertebrae cervicales, mientras que las somitas posteriores se convertirán en las vertebrae torácicas, lumbares y sacras (Holley, 2006). En fases posteriores, el desarrollo de los órganos u organogénesis presenta caracteres adecuados y distinguibles con facilidad para definir fases normales en una tabla de desarrollo (Balinsky & Fabian, 1983).

Basado en las características anteriores el proceso del desarrollo embrionario puede dividirse en dos etapas: la primera denominada desarrollo embrionario temprano, que comprende los procesos de fecundación, segmentación, blastulación, gastrulación y neurulación, el segundo proceso de esta etapa comprende la organogénesis es decir la formación de órganos (Werneburg, 2009). La segunda etapa es el desarrollo embrionario transicional según Martínez (1994) involucra la transformación de los sistemas orgánicos de la fase anterior y se forma el cuerpo del adulto a partir del estado embrionario temprano.

Estas características se relacionan con la edad, el tamaño, y peculiaridades morfológicas del embrión, propiedades que se manifiestan fácilmente con el análisis externo del mismo el cual se tiene en cuenta para realizar trabajos sobre tablas de desarrollo de fases normales (Balinsky & Fabian, 1983). Así es claro que las tablas de desarrollo embrionario permiten establecer las diferentes fases o periodos del desarrollo que suceden en todos los animales como lo son el desarrollo embrionario temprano, el desarrollo transicional y post

embrionario (Martínez, 1994). Existen varios factores que se deben tener en cuenta en el momento de elaborar una tabla de desarrollo como la densidad poblacional de embriones, la temperatura y la heterocronía según lo afirma Guevara (1997).

La temperatura es uno de los factores abióticos que más influye en el desarrollo de las tortugas ya que cada especie posee un rango óptimo para su desarrollo, a medida que la temperatura se aleja de este rango se incrementa la mortalidad y las anormalidades corporales (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007). Las temperaturas óptimas para el desarrollo normal de la *Hicotea* oscilan entre los 30 y 35°C (MAVDT-UNAL, 2009), se debe mencionar que al sobrepasar estas temperaturas el desarrollo se acelera, por lo cual el proceso normal empezará a cambiar, generando malformaciones y en casos donde la temperatura sea muy elevada o muy baja el desarrollo podrá verse interrumpido (Walsh, 2008).

Entre los procesos biológicos que explican esto, se encuentran los procesos bioquímicos, como la síntesis de proteínas, donde intervienen numerosas enzimas que aceleran o disminuyen su reacción catalítica con el aumento o reducción de la temperatura, siempre y cuando se encuentre entre el gradiente térmico de resistencia de una especie en particular (Wise *et al.*, 2009).

En cuanto a la heterocronía o velocidad desigual en el crecimiento hace referencia al proceso embrionario que no está coordinado en el tiempo, ya que existen variaciones en la aparición y diferenciación de los órganos en el ritmo de su desarrollo (Balinsky & Fabian, 1983). En algunos casos también incluye los cambios en la duración relativa de las etapas en el desarrollo de una determinada estructura (Chipman, 2002). Teniendo en cuenta esto, recientemente la heterocronía ha sido utilizada como base para analizar los diferentes patrones en el desarrollo embrionario entre las especies de vertebrados dentro de un contexto filogenético, estableciendo diferentes niveles dentro de la organogénesis lo que permite determinar estadios para las tablas del desarrollo elaboradas en fases normales (Werneburg, 2009), con la finalidad de aportar mayor cantidad de información evolutiva la cual se utiliza en un método de emparejamiento de eventos, los cuales crean secuencias que a su vez son codificadas de forma que permitan ser examinadas en un marco filogenético de manera parsimoniosa, logrando generar un consenso a nivel de familia, género, especie e incluso subespecie (Jeffery *et al.*, 2005); estas comparaciones dentro de los diferentes niveles taxonómicos muestran las relaciones de heterocronía en el desarrollo temprano y

transicional, teniendo en cuenta que la capacidad evolutiva es bastante alta, esto conlleva a una convergencia en el tiempo de cambios durante la organogénesis (Mitgutsch *et al.*, 2009). A partir de esto Werneburg (2009) establece la manera adecuada de diferenciar y describir los estadios en embriones de vertebrados empleando como ejemplo a los quelonios, en los cuales se tiene en cuenta la aparición secuencial de estructuras y órganos de acuerdo a la heterocronía de los mismos para definir los estadios.

En reptiles, aves y mamíferos existen otros factores que influyen en el desarrollo embrionario y en la elaboración de las tablas de desarrollo como la humedad, la concentración de oxígeno y dióxido de carbono, además la humedad interactúa con la temperatura para influenciar la tasa de desarrollo embrionario, así como el tamaño y el vigor de los neonatos (Rhen & Lang, 2004).

El aumento en la concentración de dióxido de carbono y la disminución de la concentración de oxígeno dentro del huevo causan asfixia en los embriones debido a la falta de intercambio gaseoso, esto está directamente relacionado con el sustrato (arena, limo, tierra, arcilla y vermiculita) en el cual se realiza la ovoposición ya que el tamaño del grano del sustrato influye en la disponibilidad de oxígeno, así los huevos ubicados en las capas inferiores del nido, tienen una menor disponibilidad de oxígeno y por consiguiente el riesgo de perecer por asfixia es mayor, debido a que a una mayor concentración de dióxido de carbono menor concentración de oxígeno; además estos embriones se encuentran soportando la presión de los huevos de las capas superiores (Arzola, 2007). Con respecto a la humedad, las crías procedentes de nidos bastantes húmedos son más grandes y contienen menos yema no metabolizada que aquellas procedente de nidos más secos, por lo tanto son más exitosos y las crías tienen mayor probabilidad de supervivencia (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

La temperatura ambiental es el factor que determina el sexo en los reptiles incluyendo dos mecanismos conocidos en vertebrados, el primero es la determinación sexual genotípica la cual se manifiesta de dos formas una que tiene cromosomas sexuales heteromórficos y otra con cromosomas sexuales homomórficos y el segundo mecanismo es la determinación sexual ambiental (Bull, 1980).

La determinación sexual genotípica es común para las tortugas dependiendo de la temperatura de incubación de los huevos, este factor es conocido como Sexo termo-

dependiente (STD) (Ewert *et al.*, 2004). Los quelonios con STD el patrón usual implica que a bajas temperaturas de incubación se producen machos y a altas temperaturas de incubación se producen hembras (Bull & Vogt, 1981), sin embargo para algunas especies de tortugas el patrón STD implica que a bajas y altas temperaturas producen hembras y temperaturas medias de incubación se producen machos (Ewert & Nelson, 1991).

Adicional es necesario tener en cuenta que existe un primer periodo de sensibilidad durante el cual el sexo es irreversiblemente fijado y las subsecuentes temperaturas son irrelevantes; las temperaturas previas al primer periodo de sensibilidad influyen la determinación sexual pero no irreversiblemente, denotándose este estadio como segundo periodo de sensibilidad (Bull & Vogt, 1981).

Se reconoce la existencia de una temperatura crítica o pivotal (Yntema & Mrosovsky, 1982) en la cual se producen igual número de individuos de ambos sexos, esta temperatura varía entre especies y entre poblaciones de la misma especie en diferentes áreas geográficas (Vogt, 1994). La determinación sexual en el embrión se produce durante la mitad del periodo de incubación, la temperatura tiene efectos aditivos y durante este periodo se requieren por lo menos 4 horas diarias de la temperatura seleccionada ya sea superior e inferior para poder obtener machos o hembras (Vogt, 1994).

5.2. Definición de la técnica histológica

La investigación en embriología depende de técnicas de laboratorio que puedan ser utilizadas para estudiar la forma y la estructura celular, de tejidos y de órganos de los embriones, ya que la mayoría de las células son demasiado pequeñas para ser observadas a simple vista (Gilbert, 2005); una técnica empleada para el estudio de embriones a nivel microscópico es la técnica histológica, la cual corresponde a una serie de procedimientos aplicados para preservar las estructuras, la organización de las células y los tejidos del embrión. Esta técnica consiste en una serie de etapas con unos pasos que van desde la toma de la muestra hasta que esta se encuentra fijada y se puede observar en un microscopio (Eynart *et al.*, 2008).

La técnica inicia con la toma de la muestra la cual puede obtenerse de un individuo vivo (biopsia) o de uno muerto (necropsia), posterior a esto se continúa con la fijación la cual consiste en la desnaturalización de las proteínas y enzimas líticas para evitar la autólisis de las células, esto se logra con una deshidratación en alcoholes la cual varía entre el 70 y el

100% de etanol, luego se debe aclarar la muestra eliminando el alcohol para permitir que la parafina se adhiera al embrión o al tejido con la finalidad de incluirlo en un taco de parafina y poder realizar el corte con un micrótopo, el cual es un instrumento de precisión cuyos cortes se realizan en micras para permitir visualizar estructuras muy pequeñas, posterior a la realización de los cortes histológicos se deben montar estos en una lamina para iniciar el proceso de desparafinación e hidratación los cuales permiten la coloración del tejido para poder contrastar las estructuras presentes; la técnica de coloración mas empleada en histología se conoce con el nombre de hematoxilina-eosina (Eynart *et al.*, 2008).

La hematoxilina es un colorante nuclear que se comporta como un colorante básico al teñir los componentes ácidos de los tejidos como por ejemplo los núcleos de las células, ya que al teñirlas se observan las estructuras como el ADN de un color de azul violáceo. Caso contrario sucede con la eosina ya que este es un colorante citoplasmático de carácter ácido el cual tiñe los componentes básicos de los tejidos, un ejemplo de ello es el citoplasma celular ya que lo tiñe en distintas tonalidades de rojo. Una vez finalizada esta coloración se realiza una deshidratación con alcohol y una aclaración con xilol para terminar el proceso, posterior a ello se fija la lamina con la laminilla y se observa al microscopio identificando las diferentes estructuras y tejidos presentes en el embrión (Eynart *et al.*, 2008).

Sin embargo se emplean otras técnicas de coloración como la histoquímica la cual corresponde al conjunto de técnicas de coloración destinadas a visualizar sustancias específicas en los tejidos, con un propósito cualitativo o cuantitativo. Esta técnica puede realizarse con fines diagnósticos (inmunohistoquímica) y/o pronóstico de innumerables enfermedades, utilizando la sustancia original la cual debe ser inmovilizada y visualizada en el microscopio en su localización celular original, luego la sustancia debe ser identificada por un procedimiento que sea específico para ella o para el grupo químico al que pertenece: lípidos (aceite rojo, tetróxido de osmio y sudanes), carbohidratos (azul de alcian, metacromasia y Periodic Acid-Schiff), proteínas (impregnación argéntica, inmunohistoquímica, histoenzimología, acidofilia y basofilia) y ácidos nucleícos (verde de metilo, pironina, anaranjado de acridina, reacción de Feulgen), de esta manera se hacen visibles estos componentes celulares (Eynart *et al.*, 2008).

6. Antecedentes

6.1. Generalidades de la subespecie

6.1.1. Ubicación taxonómica

La tortuga Hicotea de acuerdo a su clasificación taxonómica pertenece al Orden Reptilia, Clase Testudinata, Familia Emydidae, Genero *Trachemys*, Especie *Trachemys callirostris* y la Subespecie *Trachemys callirostris callirostris* (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007; MAVDT-UNAL, 2009). El género *Trachemys* cuenta con 15 especies y 17 subespecies adicionales (Rhodin *et al.*, 2008). Se registran en Colombia dos subespecies la primera *Trachemys callirostris callirostris* (MAVDT-UNAL, 2009), anteriormente conocida como *Trachemys scripta callirostris* (Gray, 1855) y la segunda *Trachemys venusta venusta* (MAVDT-UNAL, 2009) actualmente conocida como *Trachemys venusta* (Gray, 1855).

6.1.2. Identificación de la subespecie

Trachemys callirostris callirostris se reconoce fácilmente por el color amarillo del iris y la cabeza verde oliva ornamentada con cintas longitudinales amarillas y manchas redondeadas de color amarillo sobre el mentón y mandíbulas, además posee una franja ancha post orbital roja o anaranjada separada siempre del borde del ojo. El cuello y los miembros también poseen líneas longitudinales amarillas y sobre el caparazón en los escudos vertebrales, costales y marginales se observan grandes manchas redondeadas de color negro bordeadas por areolas amarillentas (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007; MAVDT-UNAL, 2009). También tiene una reticulación oscura que cubre la mayor parte del plastrón (Medem, 1975). La cabeza en su parte dorsal está cubierta por piel lisa sin escamas y las extremidades están completamente palmeadas (Fig.1). En los recién nacidos presentan una coloración más intensa, el plastrón tiene un color amarillo con un complejo patrón verde oscuro que se desvanece a medida que la tortuga envejece por las actividades realizadas a lo largo de su vida (De La Ossa & Riaño, 1999).



Figura 1. Ejemplar adulto de *Trachemys callirostris callirostris*.

6.1.3. Distribución geográfica

Las tortugas Hicoteas se encuentran en el helobioma del Magdalena y el Caribe, el cual es un tipo de pedobioma que corresponde a lugares con mal drenaje, encharcamiento permanente o con prolongado periodo de inundación (Hernandez & Sanchez, 1992). Esta subespecie es endémica de Colombia (Medem, 1975) y se distribuye desde el occidente del golfo de Urabá hasta el sur del departamento de la Guajira atravesando los sistemas cenagosos de los ríos Sinú, San Jorge y Magdalena (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

6.1.4. Hábitad y aspectos de historia natural

El hábitad de la Hicotea está constituido por un sistema de ciénagas de los grandes ríos, donde sea abundante la vegetación sumergida y disponga de numerosos sitios para asolearse, así como también de pastizales y pajonales ribereños para colocar los nidos (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007). Además gusta de las aguas mansas poco profundas y de fondos lodosos ya que en estos sitios viven las crías dentro de la vegetación flotante, mientras que los juveniles prefieren los remansos con abundante vegetación sumergida y los individuos adultos se encuentran en las zonas fluviales con corrientes y una gran cantidad de vegetación acuática (De La Ossa & Riaño, 1999).

Las Hicoteas tienen en general hábitos nocturnos pero dependiendo de las lluvias pueden tener gran actividad durante el amanecer y el atardecer, en las épocas de sequía tienen un comportamiento de estivación el cual consiste en enterrarse en el lodo y sobrevivir de las reservas hasta la aparición del periodo de lluvia; con respecto a su dieta es omnívora pero consume gran cantidad de algas y vegetación acuática, así como también renacuajos, gusanos, moluscos, insectos y artrópodos e incluso pescados muertos y barro rico en nutrientes (De La Ossa & Riaño, 1999).

6.1.5. Dimorfismo sexual

Existe un marcado dimorfismo sexual en la Hicotea, los machos son más pequeños y maduran antes que las hembras, cuando tienen una longitud del plastrón de 12 centímetros y una edad de 4 años, en tanto que las hembras tardan de 5 a 7 años en alcanzar la madurez sexual cuando tienen unos 20 centímetros de longitud del plastrón; la longitud de la cola en los machos es un indicador del estado de madurez de los mismos (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007). Las hembras alcanzan un mayor tamaño con un máximo de 35 centímetros de longitud con respecto a los machos que alcanzan una longitud máxima de 32 centímetros (De La Ossa & Riaño, 1999).

6.1.6. Reproducción

El ciclo reproductivo de la Hicotea es anual, inicia aproximadamente en septiembre con el celo y la copula la cual se lleva a cabo en aguas profundas, en los meses de enero a marzo sucede la ovoposición e inicia el periodo de incubación, la cual finaliza en los meses de abril a junio con el nacimiento de los tortuguillos, específicamente durante la época más seca del año lo cual ayuda a acelerar el proceso de incubación, disminuyendo los riesgos de inundación de los nidos y evitar la contaminación de los huevos con hongos (De La Ossa & Riaño, 1999). A diferencia de las demás especies de tortugas autóctonas suramericanas con reproducción estacional, la Hicotea puede ovopositar hasta dos o tres veces por temporada (MAVDT-UNAL, 2009).

El cortejo se caracteriza por persecuciones de varios machos nadando alrededor de una hembra; cuando ella ha seleccionado a uno de ellos se presenta una faena reproductiva con empujones y golpes suaves de la nariz de ambos animales; de esta forma, la hembra toma una actitud pasiva y así el macho monta a la hembra, proceso que por lo general se da más de una vez con intervalos entre cada copula de dos a tres minutos; en el momento en que la hembra se encuentra ya fertilizada ágilmente rehúye al macho, y a otros machos, con un nado rápido de escape tomando una actitud agresiva (Medem, 1975; De la Ossa & Botero, 2003).

La fecundación sucede siempre internamente, los espermatozoides son almacenados en los oviductos donde los huevos son fecundados a medida que va ocurriendo la postura; la copula antecede a la ovulación días o semanas (Yntema, 1968). Con respecto a los espermatozoides pueden sobrevivir en los órganos genitales de la hembra y posteriormente fecundar los huevos, la fecundación retardada que se observa en numerosas especies, muestra que la copula y la ovulación pueden ser separadas (Fox, 1977). Los espermatozoides se quedan en los repliegues vaginales hasta lograr su unión en el útero-vaginal; luego se enganchan con gran rapidez en la parte superior del oviducto, donde penetran al interior de falsas glándulas tubulares. Después de la ovulación estas células se degeneran rápidamente y parece que los espermatozoides son liberados para efectuar la fecundación (Yntema, 1968).

Las hembras viajan largas distancias desde sus hábitats de alimentación a los playones de reproducción, donde anidan comunalmente, posterior a esto las hembras depositan los huevos cerca a los cuerpos de agua (Restrepo *et al.*, 2007), por lo general los nidos

son ubicados en sitios bajo la vegetación herbácea de suelos arcillosos o limosos, relativamente endurecidos o moderadamente húmedos (De la Ossa & Botero, 2003; Restrepo *et al.*, 2007) lo cual permite al huevo absorber agua e incrementar su masa al inicio de la incubación (Bernal *et al.*, 2004).

Así, la temperatura, la humedad y la textura del suelo son críticas para la tasa de desarrollo, la supervivencia del embrión y la determinación sexual (Bernal *et al.*, 2004; Restrepo *et al.*, 2007). La temperatura y humedad de incubación de los nidos es muy cercana a los valores ambientales. Se han registrado temperaturas de incubación entre los 30 y 33°C (Medem, 1975; Restrepo *et al.*, 2007). La humedad de los nidos es moderada esta alrededor del 85% (De La Ossa & Riaño, 1999); la humedad influye de diversas formas en la incubación de los huevos, así como en el tamaño de los neonatos (Restrepo *et al.*, 2007) y en el número de huevos por nido, pues se ha reportado mayor número de nidos ovopositados en sitios con humedad moderada (Bernal *et al.*, 2004).

El periodo de incubación puede variar entre los 65 y 93 días (Medem, 1975), aunque para las poblaciones evaluadas por Piñeros (2004) y Restrepo *et al.* (2007) en la Depresión Momposina se calculó un promedio de 52.8 y 52.85 días respectivamente. El tamaño de la postura, del huevo y del neonato está relacionado directamente con el tamaño del cuerpo de la hembra (Gibbons & Greene, 1990; Daza & Páez, 2007). Generalmente la postura contiene entre 12 y 25 huevos con un tamaño aproximado de 35 x 20 mm, con una forma oblonga, la cáscara es suave de color blanco y resistente; (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

6.1.7. Desarrollo embrionario

En los chelonios el desarrollo comienza en los oviductos, la postura ocurre aproximadamente en gástrula media, debido a la retención que se realiza en los oviductos; esto les ha dado la calidad de ovovivíparos, este término supone la ausencia de contactos vasculares entre el embrión y la madre (Bouchot, 1965).

6.1.7.1. Segmentación y blastulación

Los reptiles se caracterizan por que sus huevos son telolecíticos; tienen gran cantidad de vitelo acumulado en su polo vegetal, mientras que el citoplasma se encuentra hacia el polo animal; su tipo de segmentación es meroblastica, ya que sus divisiones son incompletas debido a la gran cantidad de vitelo presente

(Yntema, 1968). Este proceso de segmentación inicia con un pequeño blastodisco, el cual se segmenta encima del vitelo insegmentado por los primeros surcos (pequeños) que lo dividen verticalmente y no afectan más que la parte central (discoblastula). Esta orientación radial de los surcos permanece durante un tiempo considerable, y así mientras que en la parte central de disco las células se vuelven más pequeñas, los núcleos periféricos colonizan progresivamente la parte periférica del disco, el cual tiene gran cantidad de células de esta manera en sentido centrífugo. En seguida los surcos toman una dirección tangencial aislando una capa superficial y una capa profunda (Fig.2), esta última está imperfectamente separada del vitelo subyacente (Yntema, 1968).

Las divisiones posteriores van a separar muchas capas de células, mientras que los núcleos más profundos y los más periféricos forman el sincitium vitelino (periblasto). Mientras que esta segmentación progresa, la capa de vitelo subyacente al embrión, bajo el efecto combinado de enzimas y probablemente del sincitium, este desaparece progresivamente dando como resultado la formación de una cavidad subgerminal. Esta no aparece sino en la parte central, mientras que en la periferia persiste un dobladillo a nivel del cual las células están apoyadas sobre el vitelo denso: zona del “parapeto vitelino”. En el curso de las fases tardías de esta segmentación, el blastodisco se pone en estado de expansión y se difunde progresivamente sobre el vitelo (Yntema, 1968).

El “parapeto” o zona vitelina, conserva una estructura con muchas capas de células superpuestas constituyendo un epitelio aplanado, en la parte central del embrión, las células de ese epitelio se condensan volviéndose cilíndricas para formar el “escudo embrionario” (Yntema, 1968).

En este momento del desarrollo el huevo visto por la parte superior, el embrión presenta dos zonas concéntricas: una central ovalada llamada área pelúcida y otra periférica llamada área opaca. Estos nombres indican que la parte central aparece más transparente en el embrión vivo, debido a la presencia de la cavidad subyacente a la capa de blastómeros. El área periférica es opaca ya que los blastómeros descansan directamente sobre el vitelo (Yntema, 1968).

El área central o pelúcida en activa división (discoblastula), se encuentra circundada por el ovoplasma, que contiene núcleos libres y forma en conjunto el

periblasto. En una etapa posterior, los blastómeros del área central se separan del vitelo subyacente. El periblasto no está destinado a participar en modo directo en la formación del cuerpo del embrión, pero tiene importancia en la descomposición del vitelo. El área pelúcida suministra material para la formación del embrión. Las células del área opaca, tienen que ver con la descomposición del vitelo subyacente y por consiguiente, de manera indirecta, suministran material alimenticio al embrión (Yntema, 1968).

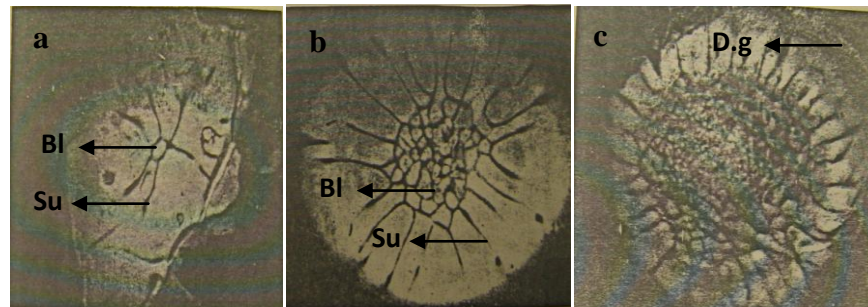


Figura 2. Segmentación y blastulación. 2a. comienzo de la segmentación, un blastómero (Bl) central se encuentra aislado y circundado por varios surcos (Su). 2b. El centro del disco se encuentra adoquinado de pequeños blastómeros circundados por surcos. 2c. El disco germinativo (D.g.) presenta blastómeros de tamaños diferentes, los más grandes en la periferia. Tomado de Yntema (1968).

6.1.7.2. Gastrulación

La gastrulación de las tortugas puede ser considerada intermedia entre mamíferos y aves, debido a la relación estrecha con la línea primitiva de los mamíferos y la placa primitiva de las aves, esta placa y línea vienen a ser conocidas en tortugas como placa blastoporal; el “canal arquenteral” no es un verdadero arquenteron, se le denomina canal notocordal, termino alusivo al canal homologo que se encuentra en ciertos mamíferos. Las células del blastodermo de las tortugas se expanden hasta la superficie del vitelo constituyendo una lámina unicelular sin endodermo. En la periferia las células permanecen planas y se expanden sobre la masa vitelina para formar un ectoblasto extraembrionario precoz, las células centrales constituyen el epitelio del escudo embrionario, después aparece a nivel del extremo posterior del escudo un surco blastoporal que circula todo el extremo posterior del huevo (Yntema, 1968).

Se produce un hundimiento de células que se propagan en profundidad, la mayor parte de estas células se dirigen hacia adelante invadiendo la cavidad subgerminal;

las células primero se condensan formando una hoja continua, otras células se dirigen hacia los lados y hacia atrás observándose de forma masiva en los bordes del blastoporo formando de esta manera la condensación celular característica de la placa blastoporal (Fig.3). Las células que han progresado hacia adelante y sobre los lados forman una lamina endoblastica embrionaria dentro del escudo; en la periferia se difunden lentamente entre el ectoblasto y el vitelo para formar poco a poco el revestimiento de la futura vesícula umbilical. El endoblasto en las tortugas se forma por una etapa de migración; la formación del cordomesodermo se realiza por proliferación e invaginación de la placa blastoporal, después de ocurridos los movimientos morfogénéticos aparece el surco blastoporal convertido en un blastoporo completo, es decir, provisto de un labio dorsal y uno ventral, este rápidamente invade la masa vitelina para formar el celoma extraembrionario, progresando también por los lados y delante del embrión. Al nivel del labio dorsal una invaginación forma un canal que se insinúa entre las dos hojas primarias; la pared ventral del canal se perfora y sus paredes se expanden dentro del ectoblasto para formar la bóveda arquenteral típica de los vertebrados (Yntema, 1968).

El material superficial converge de todas partes hacia el blastoporo, las células ahí acumuladas se invaginan y forman el canal notocordal que se hunde en dirección cefálica. Su piso se abraza íntimamente a la delgada capa endoblastica subyacente. Su pared dorsal se forma progresivamente con los materiales que se encuentran delante del blastoporo, esta pared se alarga a medida que va ocurriendo la gastrulación y aparece el tallo cordal; el piso del canal está formado por materiales situados atrás del blastoporo antes de la migración. Las células del piso permanecen temporalmente; las células posteriores se proyectan hacia atrás para formar el mesoblasto extraembrionario posterior. Las otras células del piso provenientes de regiones posteriolaterales del blastoporo, se apartan migrando hacia los lados dando como resultado un adelgazamiento del piso, que toma un aspecto vacuolar, el canal se perfora en su extremidad anterior. En estados avanzados de la gastrulación, el piso se abre progresivamente de adelante hacia atrás quedando el blastoporo separado de la cavidad subgerminal únicamente por un canal corto más o menos rectilíneo; el paso blastoporal se reduce haciéndose más angosto y se curva hacia atrás, la placa medular se cierra y se convierte en canal (Yntema, 1968).

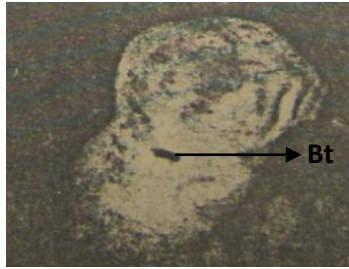


Figura 3. Gastrulación. Se forma el blastoporo (Bt) de forma rectilínea formando la región posterior del embrión. Tomado de Yntema (1968).

6.1.7.3. Neurulación

La placa medular se cierra progresivamente transformando el blastoporo en canal neural, se inicia el esbozo cerebral formado un canal transversal bilobulado que se hunde en dirección central. En la parte anterior del cuerpo los órganos se colocan hacia la línea media y reúnen las crestas endoblasticas, el cordón se aísla permitiendo que el neuroeje se cierre y se delimiten las somitas. Hacia atrás el cordón se alarga por expansión del bulbo hinchado que se encuentra adelante del canal neural y por convergencia de grupos celulares situados delante y sobre los lados del canal, se expanden las somitas pero en menor medida (Yntema, 1968).

El canal neural retrocede permitiendo que la pared posterior se dilate dentro del mesoblasto lateral para formar la placa anal, el embrión continua alargándose gracias a la extensión progresiva de los grupos celulares posteriores y también por el crecimiento de los órganos anteriores en vía de diferenciación histológica. A nivel de la placa anal, el blastodermo se adhiere a la masa vitelina; el grupo celular axial en crecimiento rechaza la masa postneural, haciendo que esta se voltee por encima y hacia atrás de la placa anal, de esta forma se diferencia el extremo caudal del embrión y el primer rastro de la pared ventral del cuerpo. La cabeza se desprende del vitelo y sus costados se levantan (Fig.4). Se inicia la formación de las membranas extraembrionarias las cuales son el corion, el amnios y el alantoides (Yntema, 1968).

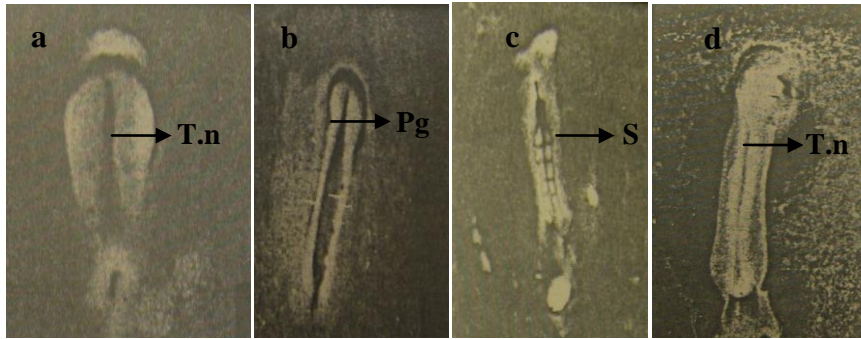


Figura 4. Neurulación. 4a. El tubo neural (T.n) se diferencia antero posteriormente, largándose la región anterior para formar el esbozo del cerebro. **4b.** Los pliegues (Pg) se encuentran delimitando la región cefálica. **4c.** Se observan 6 pares de somitas (S). **4d.** El embrión se alarga y el tubo neural se cierra. Tomado de Yntema (1968).

6.1.7.4. Membranas extraembrionarias

El ectoblasto es la membrana externa de la zona pelúcida, la cual va invadiendo la zona opaca y se va agrandando la zona germinal, al final de la gastrulación la mitad del vitelo está cubierto por dicha membrana que va a dar origen al corion y al amnios (Yntema, 1968).

Los bordes del ectoblasto y endoblasto que envuelven progresivamente el vitelo, se unen en el polo vegetal del huevo y forman una cicatriz con acumulación de células en el vitelo. La cavidad extraembrionaria o celoma se forma por el movimiento de todas las membranas extraembrionarias. El mesoblasto se diferencia en dos hojas: la esplacnopleura que queda en contacto con el endodermo y la somatopleura que está en contacto con el ectodermo; en la pared de la esplacnopleura se forman los islotes de pander-wolff, en el límite de la zona pelúcida se reúnen cúmulos de células sanguíneas para formar una primera vena: el seno marginal (Yntema, 1968).

6.1.7.4.1. Amnios y corion

El amnios aparece en forma de pliegue en el estadio de neúrcula, cubriendo la extremidad cefálica, esta membrana se extiende hacia la parte posterior del embrión en una especie de velo. En las tortugas existe un pliegue anterior y otro posterior, los cuales se unen en la parte trasera del embrión y forman la cavidad amniótica (Yntema, 1968).

El celoma extraembrionario se expande formando progresivamente una hoja periférica, la cual unida a la somatopleura constituyen el corion. Al cerrarse

la cavidad amniótica, el amnios y el corion quedan en contacto y constituyen el ligamento suspensor del amnios (Yntema, 1968).

6.1.7.4.2. Alantoides

El alantoides es un divertículo del endoblasto que se forma delante de la placa anal; en las tortugas este divertículo aparece cuando la extremidad posterior y la cola, se repliegan hacia la derecha mientras que el embrión queda sobre su lado izquierdo. La vesícula alantoidea empuja la esplacnopleura y forma una bolsa compuesta por dos capas: la mesoblastica y la endoblastica, esta bolsa está unida a la cloaca por un pedúnculo hueco que sale al celoma extraembrionario (Yntema, 1968).

6.1.7.4.3. Vesícula umbilical y alantocorion

El embrión no se encuentra separado del vitelo sino cuando aparecen los pliegues del cuerpo, estos pliegues separan al embrión del vitelo para formar un pedúnculo vitelino que está compuesto por las tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo), a través del cual se comunica el embrión con el vitelo. Gracias al seno marginal, las arterias y venas vitelinas pasan la alimentación al embrión (Yntema, 1968).

La hoja superficial de la bolsa alantoidea se despliega hasta unirse con el corion y forma el alantocorion o membrana corialantoidea. El pedículo alantoideo permite el paso de vasos umbilicales o alantoideos, que se arborizan formando una red alantocoroidea, que aplicada contra la cascara asegura la respiración. La arteria umbilical transporta sangre venosa mientras que las venas umbilicales transportan sangre arterial (Yntema, 1968).

La bolsa alantoidea se extiende hasta cubrir la parte inferior del huevo, la membrana corialantoidea recubre toda la parte interna de la cascara; la hoja interna de la membrana alantoidea cubre el amnios y la vesícula umbilical (Yntema, 1968). El cordón umbilical lo forman el pedículo umbilical y las venas onfalomesentericas; el tortuguillo al nacer tiene todavía gran cantidad de vitelo en la vesícula umbilical, su absorción finaliza entre las placas del plastrón abdominal (Greenbaum, 2002).

6.1.8. Importancia socio económica

La Hicotea es una subespecie de la fauna silvestre que es objeto de uso y comercio en el territorio colombiano, siendo una de las principales fuentes de proteína e ingresos económicos para numerosas familias en la región Caribe (MAVDT-UNAL, 2009). El consumo de huevos y carne está asociado a creencias populares que atribuyen resistencia a las personas y poderes afrodisiacos, además de sus múltiples formas de preparación hace que sea empleada en la gastronomía de la costa Caribe (Gutiérrez, 2005). La carne de la Hicotea es consumida durante la cuaresma y la semana santa por creencia religiosa y paradigmas (Palacios *et al.*, 1999). Siendo la época del año en la cual se extraen más ejemplares de la Hicotea y se comercializan en mayor cantidad, en estos días los vendedores obtienen entre \$200.000 y \$300.000 al día por la venta de 86 ejemplares en promedio. Los vendedores comentan que en la temporada de diciembre a abril pueden vender entre \$40.000 y \$60.000 diarios en Hicoteas, es decir cerca de \$2'000.000, mensuales durante esta temporada por lo cual es una actividad rentable para ellos (MAVDT-UNAL, 2009).

6.2. Trabajos realizados a nivel embrionario

En el orden *Chelonia* se han realizado a nivel mundial trabajos con diferentes especies de tortugas. Greenbaum & Carr (2002) elaboraron la tabla de desarrollo embrionario para la tortuga *Apalone spinifera* con el objetivo de conocer el tiempo de desarrollo, las dimensiones del embrión y la temperatura. Greenbaum (2002) describió 27 estadios del desarrollo embrionario de *Trachemys scripta*, basándose en la tabla de desarrollo de *Chelydra serpentina*. Tokita & Kuratani (2001) describieron y elaboraron la tabla de desarrollo embrionario para la tortuga *Pelodiscus sinensis* identificando 23 estadios desde el momento de la postura hasta el momento de la eclosión. Mora (1985) elaboro la tabla de desarrollo de la tortuga charapa *Podocnemis expansa* en el rio Caquetá (Colombia) identificando las características morfológicas durante el tiempo de desarrollo del embrión el cual duro 60 días. Yntema (1968) describió 26 estadios del desarrollo embrionario de *Chelydra serpentina*, por primera vez describió como sucede el desarrollo embrionario en las primeras etapas (internamente en la tortuga).

7. Objetivos

7.1. General

Describir los estadios del desarrollo embrionario de la tortuga Hicotea *Trachemys callirostris callirostris* en condiciones de cautiverio en el Parque Recreativo y Zoológico Piscilago.

7.2. Específicos

- ∞ Describir los cambios del desarrollo a nivel macroscópico en cada estadio embrionario de *Trachemys callirostris callirostris*.
- ∞ Describir secuencialmente los cambios del desarrollo a nivel histológico en los primeros estadios embrionarios de *Trachemys callirostris callirostris*.
- ∞ Comparar los cambios macroscópicos con los histológicos.
- ∞ Registrar el tiempo de cada estadio del desarrollo embrionario.
- ∞ Registrar el tiempo total del desarrollo embrionario.

8. Metodología

8.1. Área de estudio

El Parque Recreativo y Zoológico Piscilago se encuentra ubicado en Girardot (Colombia), este parque es un centro recreativo y cultural localizado en el Kilómetro 105 vía Bogotá-Girardot, en las coordenadas 4° 12' 42.16" N y 74° 40' 46.67" W, a 289 metros de altitud, con una temperatura media anual de 28°C y una precipitación de 1541mm. El Zoológico de Piscilago ocupa una gran área de las 86 hectáreas que constituyen el Parque. Actualmente, consta de 924 animales que representan 174 especies ubicadas en exhibiciones como aviarios, primates, serpentario, nutrias, acuario y tortugario entre otros. El estudio se llevara a cabo en el tortugario (Fig. 5), en esta área del parque se encuentran 86 ejemplares de tortugas pertenecientes de 7 familias (Chelidae, Chelydridae, Emydidae, Kinosternidae, Pelomedusidae, Tryonychidae) de la Clase Testudinata; con respecto a la familia Emydidae encontramos 22 individuos de la subespecie *Trachemys callirostris callirostris* en una mayor proporción hembras (14) y en una mayor proporción machos (8); además este sitio cuenta con dos playas de arena en las cuales pueden las tortugas realizar el desove, con respecto a la temperatura del agua y la humedad son iguales al ambiente favoreciendo así la reproducción de las tortugas.



Figura 5. Tortugario del Parque Recreativo y Zoológico Piscilago.

8.2. Procedimientos en el sitio de muestreo

La descripción macroscópica en cada estadio del desarrollo embrionario se realizó teniendo en cuenta los siguientes tiempos en los cuales se extrajeron los huevos de los nidos iniciando a las 0, 13, 15, 20, 24, 29, 34, 40, 48, 60, 72, 84, 96 y 120 horas, luego se continuo con estas observaciones cada 5 días retomando desde el día 10 hasta el día 60 (Werneburg, 2009), lo cual corresponde al periodo de incubación natural (60 días) desde la postura hasta la eclosión (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007). El n-muestral de esta investigación fue de 96 huevos los cuales fueron tomados de 7 nidos realizando 4 repeticiones por estadio.

Posterior al desove y a la recolección del huevo correspondiente a la hora cero el nido fue marcado con una bandera (compuesta por un palo y un plástico en forma rectangular) para ser identificado; esta bandera se marcó con un número para ser registrado en un formato, el cual contiene información adicional con los siguientes datos: fecha de postura, fecha de recolección y número de huevos recolectados. El formato se llenó por cada nido estudiado al momento de retirar el huevo en cada tiempo establecido. Luego se destapo el huevo con ayuda de una aguja y unas pinzas, el embrión se colocó en una caja de petri y se observó en el estereoscopio (marca Esterozoom) para realizar la descripción macroscópica, en esta descripción se tuvo en cuenta características como el tamaño del embrión, la cabeza, los ojos, los oídos, las costillas, el caparazón, el plastrón, la cola y las extremidades características que dependían de cada estadio, lo anterior se conoce como el análisis macroscópico externo general y específico (Werneburg, 2009), a medida que se iba realizando este análisis se hizo un registro con las anotaciones correspondientes a los

cambios morfológicos; posterior a esto los embriones fueron medidos con un calibrador y se registraron fotográficamente con una cámara fotográfica Canon.

Finalmente por cada huevo retirado de los diferentes nidos en los tiempos establecidos se colocó un embrión por cada fijador en un frasco plástico; se utilizaron dos fijadores, formol buferizado (100 ml de formol puro, 900 ml de agua destilada, 4 gr de fosfato monobásico y 6,5 gr de fosfato dibásico) para realizar la descripción macroscópica, y buoin (22,5 gr de ácido pícrico, 7,5 ml de formol puro y 5 ml de ácido) para realizar la descripción histológica, con la finalidad de preservar los tejidos (Simmons, 1995).

Para registrar del tiempo de desarrollo de cada estadio y el total del desarrollo se usó un cronometro (para medir el tiempo) desde que ocurrió la ovoposición (tomándolo como el tiempo cero) hasta el momento de la eclosión (tiempo final) y a medida que se vaya presentando cada uno de los cambios en los tiempos establecidos anteriormente. Con las 4 repeticiones por cada tiempo seleccionado se realizarán promedios de los tiempos transcurridos entre cada estadio. Los procedimientos estadísticos que se llevaron a cabo para establecer el tiempo de duración en cada estadio son las medidas estadísticas fundamentales como promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (Box *et al.*, 2008).

8.3. Procedimientos de laboratorio

Para realizar la descripción histológica de los embriones se trasladaron al laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Javeriana; teniendo en cuenta que los embriones se fijaron en bouin se inicia el proceso de deshidratación en el cual los embriones son pasados en forma sucesiva en alcoholes (etanol) de concentraciones ascendentes: 70%, 90%, 95%, y 100% cada 20 minutos, teniendo en cada frasco 2 ml del alcohol respectivo. Después de pasar dos veces por el alcohol del 100%, se colocaron en 1 ml alcohol del 100% más 1 ml de xilol por 20 minutos. Una vez completado el proceso anterior, se inició la inclusión en parafina, se pasaron los embriones a xilol – parafina, luego a parafina 1, parafina 2 y parafina 3, todos con un tiempo de 20 minutos. Para finalizar el proceso de inclusión los embriones se pasaron a una caja de papel con parafina, dejándose solidificar poco a poco hasta armar una especie de colchón con una altura aproximadamente de 0.3mm a 0.5mm, mientras tanto la superficie se va moviendo suavemente con una aguja de disección caliente con el fin de evitar que la parafina se enfríe y se solidifique (Eynart *et al.*, 2008).

Luego se continuo el proceso colocando el taco (el cual sale de la caja de parafina) sobre un rectángulo de madera, para poder colocar este rectángulo en el micrótomo y así poder realizar cortes seriados transversales en todo el embrión con espesor de 5 micras, posteriormente fueron recogidas en láminas portaobjetos y se fijaron estos cortes con fuego (utilizando un mechero de alcohol). Los cortes se colorearon con la técnica de hematoxilina – eosina, esta coloración tiene dos etapas la primera es la de hidratación la cual consiste en sumergir la lamina portaobjetos en xilol puro por un periodo de 2 minutos, alcoholes de 100%, 95%, 90%, y 70 % dejando la lamina 2 segundos por cada alcohol, luego se coloca la lamina en hematoxilina durante cuatro minutos se juago con agua, se pasa a agua destilada y finalmente se coloca la lamina en eosina por dos minutos; la segunda etapa es la deshidratación, se sumerge la lamina 2 segundos en alcoholes de 70%, 90%, 95% 100%, xilol con alcohol al 100% y xilol puro. Finalmente se coloca sobre esta lámina portaobjetos una laminilla cubreobjetos fijándola con un entellan (pegante) (Eynart *et al.*, 2008).

Se observaron estos cortes al microscopio (marca Olympus) y se realizo la descripción de los embriones y cada una de las estructuras presentes. Los cortes histológicos se realizaron desde el estadio II hasta el Estadio VII, ya que después de este tiempo no fue posible realizar los cortes por la dureza de los embriones, los estadios VIII al XVI fueron descritos solo macroscópicamente.

9. Resultados

ESTADIO I: Disco embrionario

Hora 0 – 71

“Inicia desde la ovoposición hasta el inicio de la curvatura cefálica”

El embrión fijado a las 0 horas después de la ovoposición se caracteriza por presentar el disco germinal el cual está compuesto por el área opaca y el área pelúcida o área clara, esta área clara es circular inicialmente; en un momento dado del desarrollo posterior al área pelúcida la cual se va tornando cada vez mas ovalada, se constituye un espesamiento celular redondo formando la placa o área primitiva. Su presencia indica el comienzo de los movimientos gastrulares. En estadios sucesivos el área pelúcida logra circundar la placa primitiva.

A medida que el desarrollo procede, en la placa primitiva se insinúa una introflexión que se torna cada vez más pronunciada constituyendo la prolongación cefálica (notocorda). Al inicio de la neurulación se observa la placa embrionaria y el surco neural en la parte media posterior del embrión. En este mismo estadio se observa el proceso cefálico en la parte anterior del embrión (Fig.6). Este estadio dura en promedio 2 días y 9 horas.

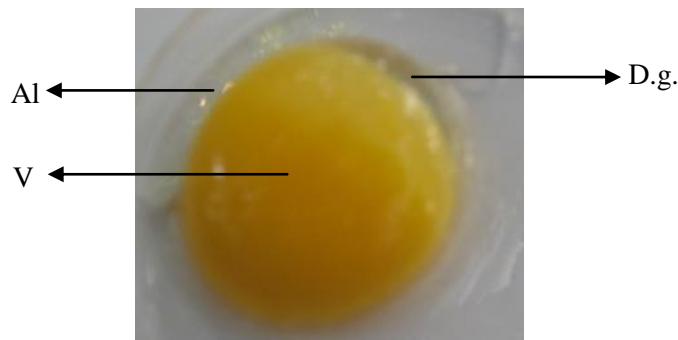


Figura 6. Disco embrionario. (Al) Albumen; (D.g.) Disco germinal; (V) Vitelo.

ESTADIO II: Curvatura cefálica

Hora 72– 83

“Comprende desde la formación de la curvatura cefálica hasta la formación de la curvatura cervical”

El embrión fijado a las 72 horas después de la ovoposición se caracteriza por presentar dos regiones: anterior y caudal. En la región anterior se observan las tres vesículas encefálicas primarias: la primera de ellas es el prosencéfalo, la segunda el mesencéfalo y la tercera el romboencéfalo; a nivel del prosencéfalo se observa el esbozo de la vesícula óptica y la

proyección del rostro; se identifica en el mesencéfalo una pequeña curvatura correspondiente a la cefálica; en el romboencéfalo se inicia el esbozo del corazón (Bolsa cardiaca). La región caudal permanece tubuliforme y se observan las somitas (Fig.7). Este estadio dura en promedio 4 horas y 17 minutos.

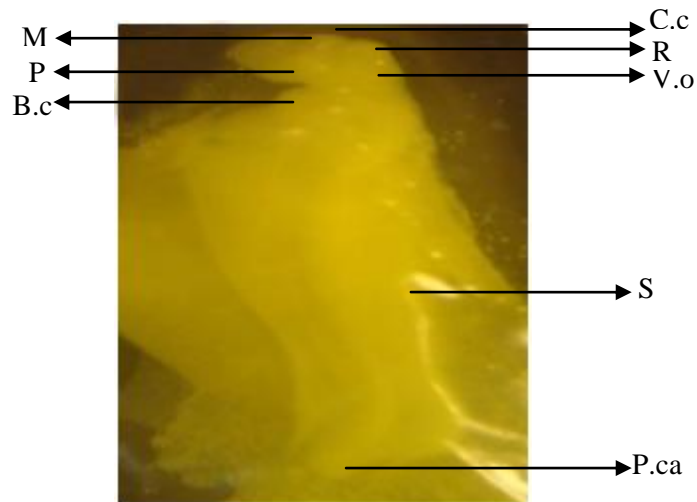


Figura 7. Curvatura cefálica. (B.c) Bolsa cardiaca; (C.c) Curvatura cefálica; (M) Mesencéfalo; (P) Prosencéfalo; (P.ca) Proceso caudal; (R) Romboencéfalo; (S) Somitas; (V.o) Vesícula óptica.

En los cortes histológicos transversales seriados desde la región anterior hasta la posterior se puede identificar primero las vesículas encefálicas secundarias; a nivel del telencéfalo se observan las placodas olfatorias, en el diencéfalo se ve la cúpula óptica con el cristalino situado en la parte central hacia la periferia de esta; se observa el esbozo del corazón (Fig.8.a); en la región posterior se aprecian las somitas, el tubo neural, la notocorda, la aorta dorsal fusionada además de cavidades celómicas intraembrionarias rodeadas de células mesenquimáticas. Recubriendo el embrión se encuentra internamente el amnios y externamente la somatopleura o corion (Fig.8.b).

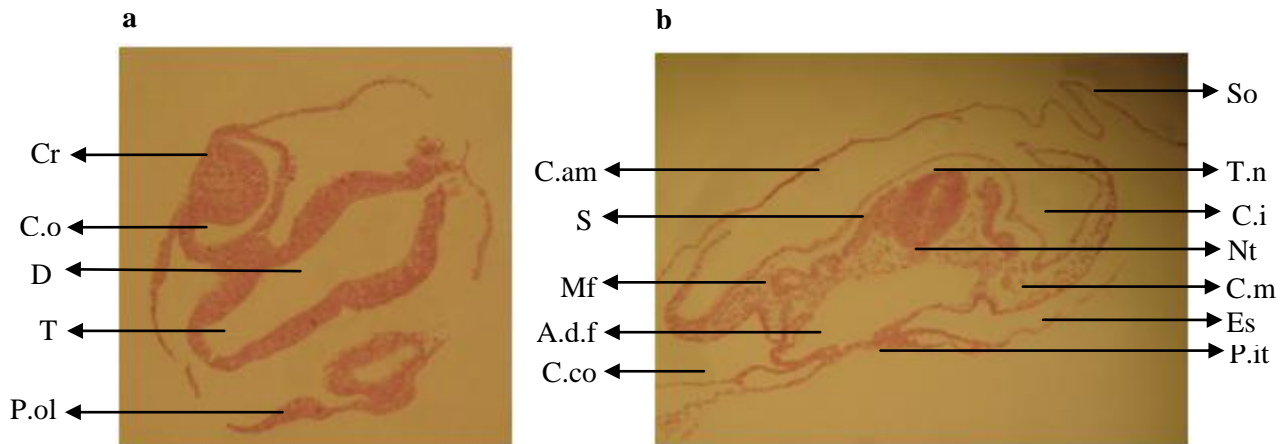


Figura 8. Corte histológico transversal. 8.a. Parte anterior. 8.b. Parte posterior. (A.d.f) Aorta dorsal fusionada; (C.am) Cavidad amniótica; (C.co) Cavidad coriónica; (C.i) Celoma intraembrionario; (C.m) Células de mesenquima; (C.o) Cúpula óptica; (Cr) Cristalino; (D) Diencefalo; (Es) Esplacnopleura; (Mf) Mesonefros; (Nt) Notocorda; (P.it) Portal intestinal; (P.ol) Placoda olfatoria; (S) Somitas; (So) Somatopleura; (T) Telencéfalo; (T.n) Tubo neural.

ESTADIO III: Curvatura cervical

Hora 84– 95

“Comprende desde la formación de la curvatura cervical hasta el inicio de la curvatura Pontina”

El embrión fijado a las 84 horas después de la ovoposición se caracteriza por presentar la curvatura cervical, se encuentra entre el romboencéfalo y la medula espinal, en esta curvatura se presentan los pliegues dérmicos en proceso de formación del caparazón. Las tres vesículas encefálicas primarias han variado de tamaño, a nivel del prosencéfalo se observa el rostro con una proyección antero lateral a la vesícula óptica, la cual ha aumentado de tamaño diferenciándose en el centro de esta la fosita cristalina, se observa la placoda olfatoria, además se inicia la formación del oído externo; se identifica en el mesencéfalo una curvatura correspondiente a la cefálica; en el romboencéfalo se ve el cambio en el aumento del tamaño del corazón y la formación de los arcos faríngeos; la red sanguínea se ha establecido en la extensión del disco embrionario; se inicia el esbozo de los miembros anteriores; la región caudal se observa el tubo neural y las somitas son poco visibles; en la parte posterior del embrión la cola ha iniciado su alargamiento (Fig.9). Este estadio dura en promedio 4 horas y 6 minutos.

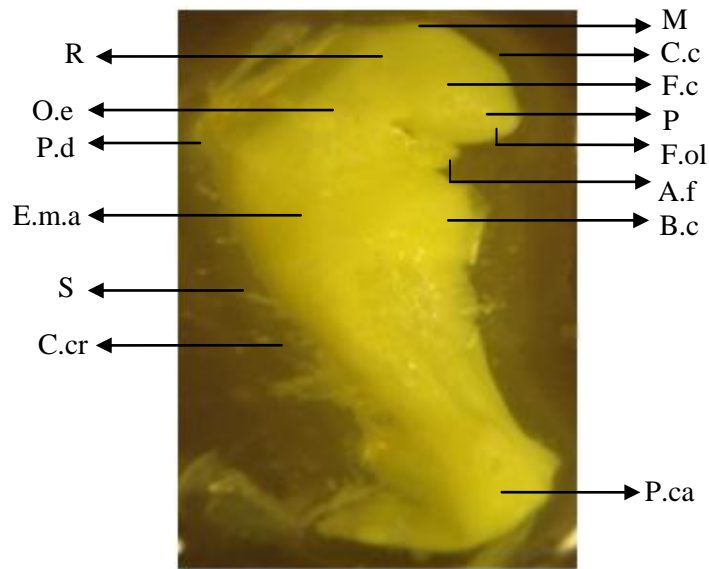


Figura 9. Curvatura cervical. (A.f) Arcos faríngeos; (B.c) Bolsa cardiaca; (C.c) Curvatura cefálica; (C.cr) Curvatura cervical; (E.m.a) Esbozo miembro anterior; (F.c) Fosita cristaliniiana; (F.ol) Fosita olfatoria; (M) Mesencéfalo; (O.e) Oído externo; (P) Prosencéfalo; (P.ca) Proceso caudal; (P.d) Pliegues dérmicos; (R) Romboencéfalo; (S) Somitas.

Al hacer observaciones histológicas por niveles, iniciando en la parte anterior y terminado en la parte caudal, se observa que las vesículas encefálicas secundarias presentan un mayor desarrollo; el corazón, la aorta dorsal y las venas cardinales anteriores tienen un mayor tamaño con respecto al estadio anterior; la caracterización de este estadio se da por el inicio de la diferenciación de las bolsas faríngeas, el surco laringotraqueal, los pulmones y los bronquios; en el área digestiva se observan asas intestinales, pronefros, luego el hígado y finalmente el conducto biliar (Fig.10).

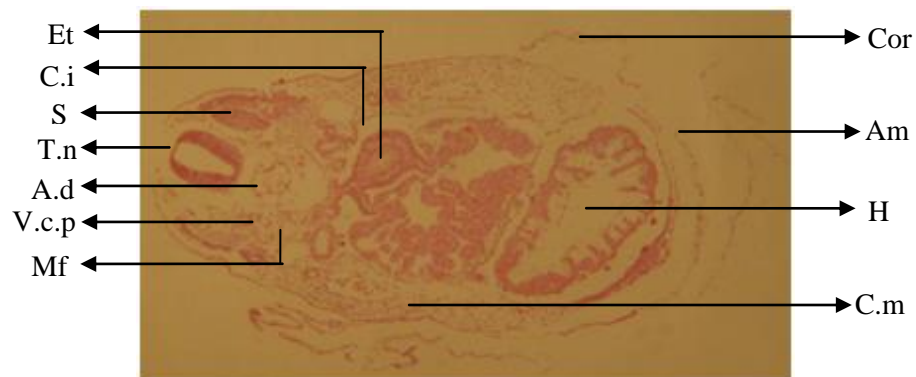


Figura 10. Corte histológico transversal de la parte media. (A.d) Aorta dorsal; (Am) Amnios; (C.i) Celoma intraembrionario; (C.m) Células de mesenquima; (Cor) Corión; (Et) Estomago; (H) Hígado; (Mf) Mesonefros; (S) Somitas; (T.n) Tubo neural; (V.c.p) Vena cardinal posterior.

ESTADIO IV: Curvatura pontina

Hora 96– 119

“Comprende desde la formación de la curvatura pontina hasta la formación de las tres cámaras del corazón”

El embrión fijado a las 96 horas, ostenta un desarrollo apto para la formación de la curvatura pontina. La región cefálica muestra las tres vesículas encefálicas primarias iniciando su división para dar origen a las vesículas encefálicas secundarias; a nivel del prosencéfalo las placodas ópticas y olfatorias son de forma redondeada, estas placodas se originan por una interacción del tubo neural y el ectodermo epidérmico permitiendo así la formación de los órganos de los sentidos; la proyección rostral esta culminada; en el romboencéfalo la bolsa cardiaca muestra su carácter funcional al bombear fluido sanguíneo y se localiza frente a la porción dorsal que ahora se está formando, se observan los arcos faríngeos; en la región anterior los pliegues dérmicos están un poco mas unidos; el esbozo del miembro anterior tiene un poco mas de longitud con respecto al estadio anterior; en la parte posterior se aprecian los flancos redondeados y los tubos mesonéfricos; (Fig.11). Este estadio dura en promedio 9 horas y 27 minutos.

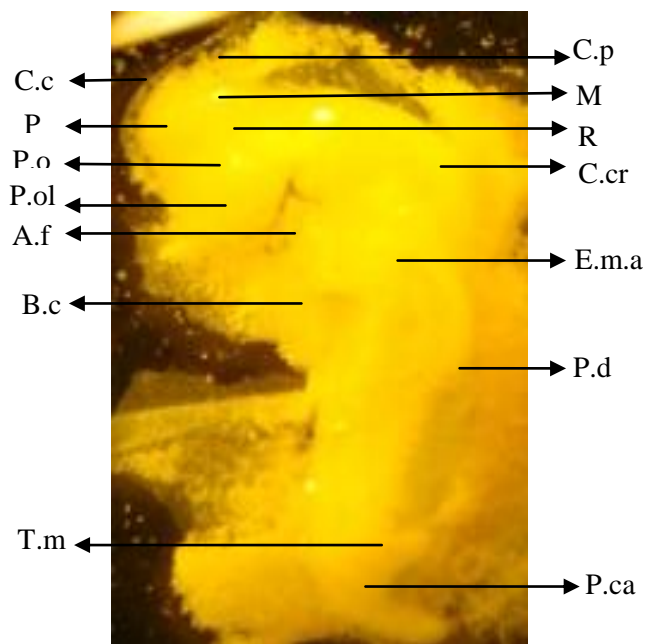


Figura 11. Curvatura pontina. (A.f) Arcos faríngeos; (B.c) Bolsa cardiaca; (C.c) Curvatura cefálica; (C.cr) Curvatura cervical; (C.p) Curvatura pontina; (E.m.a) Esbozo miembro anterior; (M) Mesencéfalo; (P) Prosencéfalo; (P.ca) Proceso caudal; (P.d) Pliegues dérmicos; (P.o) Placoda óptica; (P.ol) Placoda olfatoria; (R) Romboencéfalo; (T.m) Tubos mesonéfricos.

Los cortes histológicos permiten observar en la región cefálica (diencéfalo) la formación de los tallos ópticos, de la cúpula óptica, del cristalino y la epífisis (Fig.12.b); en la parte media y posterior observamos la notocorda, la médula espinal, el corazón con tres cámaras (dos aurículas y un ventrículo), la aorta dorsal fusionada, el surco laringotraqueal, el conducto de cuvier, los arcos faríngeos y branquiales, los arcos aórticos, las bolsas faríngeas y el saco tiroideo; entre todas estas estructuras se observan células de mesenquima o tejido de relleno (Fig.12.a y Fig.12.c).

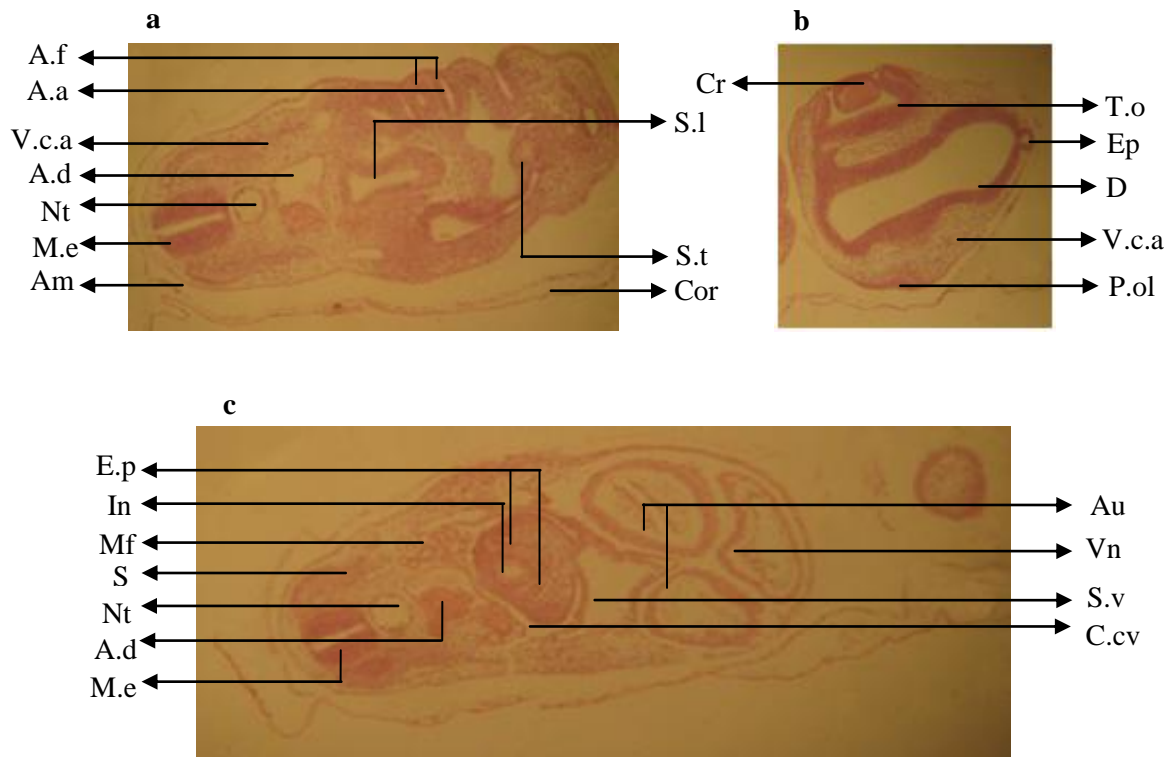


Figura 12. Corte histológico transversal. 12.a. Parte posterior a la región cefálica. 12.b. Parte anterior. 12.c. Parte media. (A.a) Arco aórtico; (A.d) Aorta dorsal; (A.f) Arcos faríngeos; (Am) Amnios; (Au) Aurícula; (Cor) Corión; (Cr) Cristalino; (C.cv) Conducto de cuvier; (D) Diencéfalo; (Ep) Epífisis; (E.p) Esbozo de pulmones; (In) Intestino; (M.e) Médula espinal; (Mf) Mesonefros; (Nt) Notocorda; (P.ol) Placoda olfatoria; (S) Somitas; (S.l) Surco laringotraqueal; (S.t) Saco tiroideo; (S.v) Seno venoso; (T.o) Tallo óptico; (Vn) Ventrículo; (V.c.a) Vena cardinal anterior.

ESTADIO V: Formación de las tres cámaras del corazón

Día 5 – 9

“Comprende desde la formación de las tres cámaras del corazón hasta el esbozo de la mandíbula”

El embrión fijado a los 5 días presenta una inclinación corporal debido al plegamiento antero posterior correspondiente a la curvatura cefálica; en la región cefálica se han diferenciado las cinco vesículas encefálicas la primera de ellas es el telencéfalo, la segunda es diencéfalo, la tercera corresponde al mesencéfalo, la cuarta es el metencéfalo y la quinta es el mielencéfalo; en la región media se observa el corazón el cual se ha formado completamente ya que presenta las tres cámaras (dos aurículas y un ventrículo) características de los reptiles; en la región posterior el crecimiento de la cola es evidente y se inicia el esbozo de los miembros posteriores (Fig.13). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

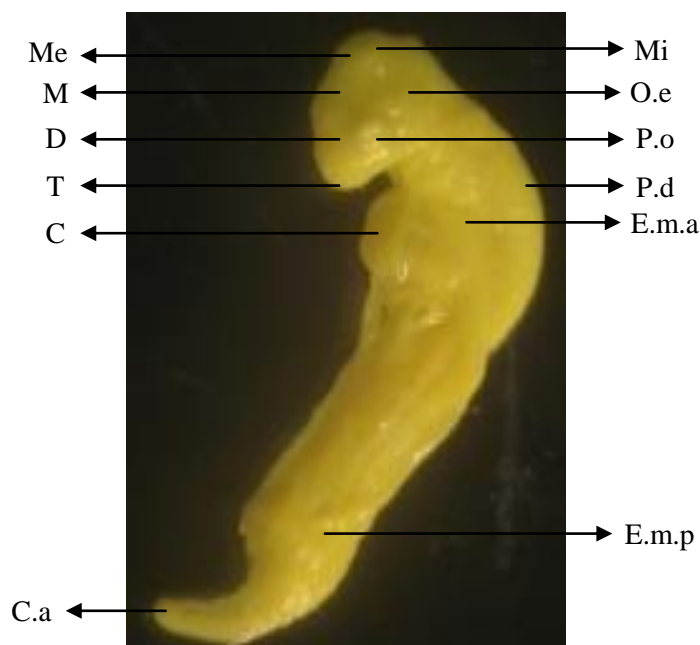


Figura 13. Formación del corazón. (E.m.a) Esbozo miembro anterior; (E.m.p) Esbozo miembro posterior; (D) Diencéfalo; (C) Corazón; (C.a) Cola alargada; (M) Mesencéfalo; (Me) Metencéfalo; (Mi) Mielencéfalo; (O.e) Oído externo; (P.o) Placoda óptica; (P.d) Pliegues dérmicos; (T) Telencéfalo.

En los cortes histológicos se observa en la parte anterior la pigmentación retinal (cúpula óptica), aumento en el tamaño del cristalino y placodas olfatorias; en la parte posterior observamos los arcos faríngeos, los arcos aórticos, el conducto de cuvier, los lóbulos del hígado, mesonefros, el corazón, el infundíbulo, la tráquea y los pulmones (Fig.14).

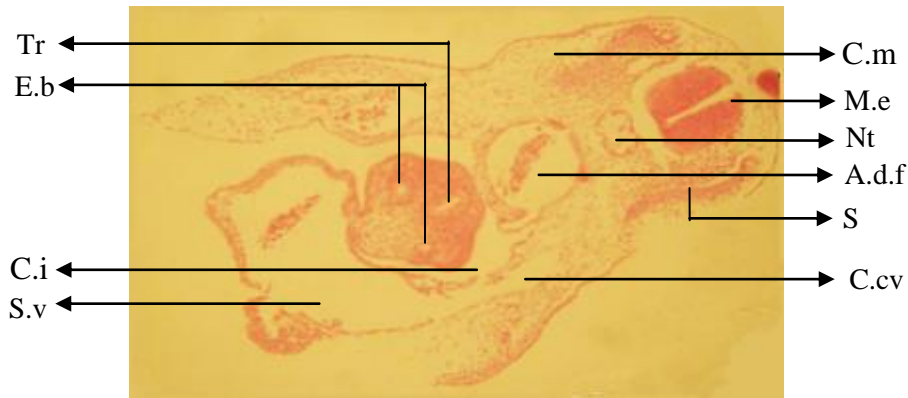


Figura 14. Corte histológico transversal de la parte media. (A.d.f) Aorta dorsal fusionada; (C.cv) Conducto de cuvier; (C.i) Celoma intraembrionario; (C.m) Células de mesenquima; (E.b) Esbozo de bronquios; (M.e) Médula espinal; (Nt) Notocorda; (S) Somitas; (S.v) Seno venoso; (Tr) Tráquea.

ESTADIO VI: Esbozo de la mandíbula

Día 10 - 14

“Comprende desde la formación del esbozo de la mandíbula hasta el crecimiento de las extremidades en forma de bala”

El embrión fijado a los 10 días se observa totalmente curvado de tal forma que adquiere una configuración en semiluna; la región cefálica tiene más diferenciadas sus vesículas encefálicas secundarias, se observa la proyección de la epífisis, en las vesículas ópticas se observa la vesícula cristaliniiana, además se esboza la fisura mandibular; la porción del cuello se ha demarcado; el mayor plegamiento antero posterior se ha establecido en el dorso del embrión debido a las curvaturas cervical y pontina, los pliegues dérmicos se muestran con un mayor desarrollo; los miembros anteriores y posteriores tienen una forma alargada, se han localizado lateralmente en el cuerpo de forma simétrica, están unidos a el cuerpo por una depresión lateral; el alantoides se encuentra avanzado ocupando la porción lumbar; la cola inicia su acortamiento con respecto al tamaño corporal (Fig.15). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

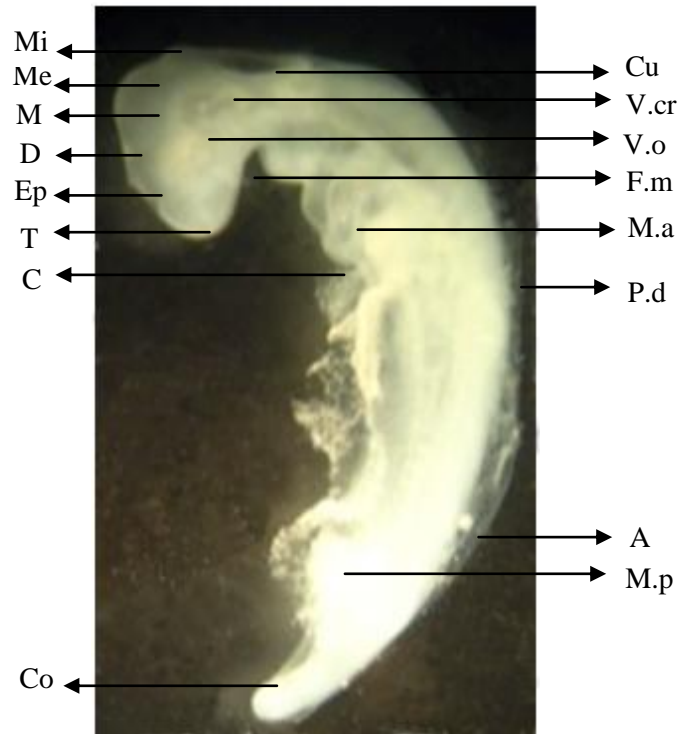


Figura 15. Esbozo de la mandíbula. (A) Alantoides; (C) Corazón; (Cu) Cuello; (Co) Cola; (D) Diencefalo; (Ep) Epífisis; (F.m) Fisura mandibular; (M) Mesencéfalo; (M.a) Miembro anterior; (Me) Metencéfalo; (Mi) Mielencéfalo; (M.p) Miembro posterior; (P.d) Pliegues dérmicos; (T) Telencéfalo; (V.cr) vesícula crsitaliniana; (V.o) Vesícula óptica.

Al hacer observaciones histológicas en la parte anterior del embrión se aprecia la medula espinal, la notocorda, el surco laringotraqueal, los pulmones, los pronefros y mesonefros, el asa intestinal, el intestino y el esbozo del miembro anterior (Fig.16).

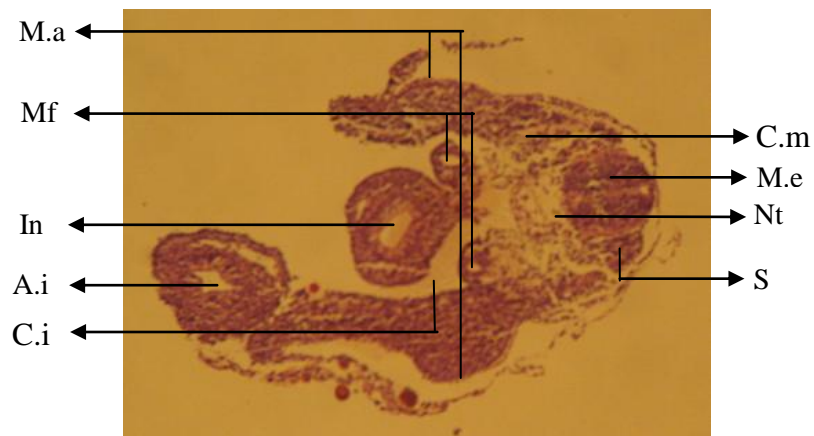


Figura 16. Corte histológico transversal de la parte anterior. (A.i) Asa intestinal; (C.i) Celoma intraembrionario; (C.m) Células de mesenquima; (In) Intestino; (M.a) Miembro anterior; (M.e) Médula espinal; (Mf) Mesonefros; (Nt) Notocorda; (S) Somitas.

ESTADIO VII: Crecimiento de las extremidades en forma de “bala”

Día 15 - 19

“Comprende desde el crecimiento de las extremidades en forma de bala hasta el inicio de la formación del caparazón”

El embrión fijado a los 15 días se caracteriza por presentar en la región cefálica el proceso mandibular el cual se encuentra ubicado debajo del ojo; en la cúpula óptica se observa de manera central el cristalino y periféricamente se ha iniciado la pigmentación retinal. Las vesículas encefálicas secundarias han tomado una forma ovalada, prominente y transparente; comienza la migración hacia el interior de la vesícula del otocisto; las placodas olfatorias han dado origen al esbozo de la narina. Tras la curvatura cervical se define el proceso para la formación del esbozo del caparazón el cual había iniciado con la definición de pliegues dérmicos ubicados en la porción latero dorsal del embrión prolongándose hasta el nivel pélvico. El corazón muestra externamente la aorta la cual se encuentra bien definida. Sobre la región torácica en posición lateral se observa el par de miembros anteriores los cuales se caracterizan por estar alargados en forma de bala. Los miembros posteriores, son de menor tamaño, están inclinados respecto a su unión y delimitan la región pélvica. En la parte posterior el proceso de la cola esta mas alargado y muestra una base ensanchada y el extremo curvado. En la parte ventral se observa el cordón umbilical (Fig.17). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

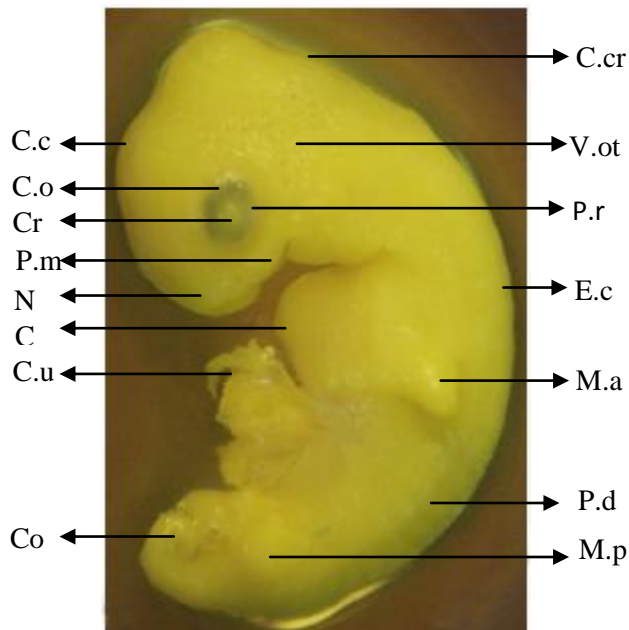


Figura 17. Formación de las extremidades. (C) Corazón; (Co) Cola; (C.c) Curvatura cefálica; (C.cr) Curvatura cervical; (C.o) Cúpula óptica; (Cr) Cristalino; (C.u) Cordón umbilical; (E.c) Esbozo del caparazón; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (N) Narina; (P.d) Pliegues dérmicos; (P.m) Proceso mandibular; (P.r) Pigmentación retinal; (V.ot) Vesícula del otocisto.

En los cortes histológicos se observa en la parte anterior los hemisferios cerebrales, el tálamo e hipotálamo; un mayor aumento y pigmentación en el ojo; se diferencia la fosita de la placoda olfatoria; en la boca se identifica la mandíbula, la maxila y el esbozo de la carúncula; en el oído se observa el canal semicircular, el sáculo y el utrículo. En la parte posterior se observa un mayor crecimiento de los miembros (Fig.18).

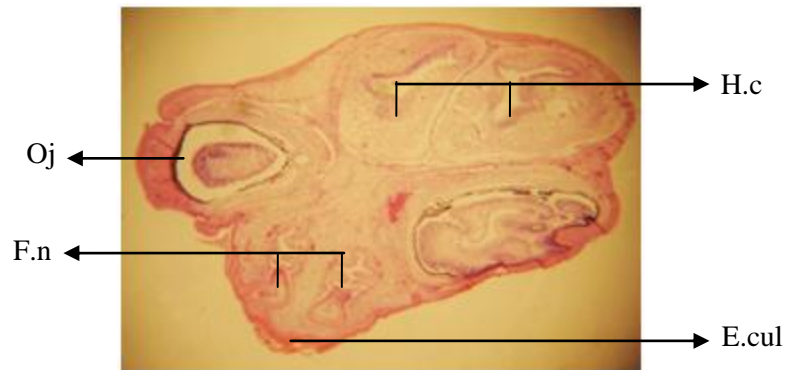


Figura 18. Corte histológico transversal de la parte anterior. (E.cul) Esbozo de la carúncula; (F.n) Fosa nasal; (H.c) Hemisferios cerebrales; (Oj) Ojo.

ESTADIO VIII: Formación del caparazón

Día 20 - 24

“Comprende desde el inicio de la formación del caparazón hasta la formación de la mandíbula”

El embrión fijado a los 20 días se observa alargado dorsalmente sin perder sus tres curvaturas (cefálica, cervical y pontina); el rostro presenta un leve achatamiento y el ojo se encuentra completamente formado, siendo evidente el reflejo pupilar. El proceso mandibular alcanza el nivel del ojo y el mesencéfalo se hace prominente sobre la cabeza para dar origen a los hemisferios cerebrales. Se delimita la porción anterior del caparazón definido por los pliegues dérmicos los cuales se identificaron en el estadio anterior (VII), permitiendo la completa formación de este, el caparazón se extiende desde el cuello hasta la cloaca, en esta extensión se muestran sus bordes laterales y un engrosamiento dorsal arqueado. Las extremidades tanto anteriores como posteriores presentan el inicio de la muesca para la formación de los dedos. La transparencia del cuerpo ya no se observa y en la región torácica se delimita el pecho (Plastrón); se inicia la contracción muscular; posterior a esta región emergen desde el ombligo cutáneo el pedúnculo vitelino y alanatoideo. El proceso de cola se ha completado, se curva hacia el cuerpo y se establece la zona cloacal (Fig.19). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

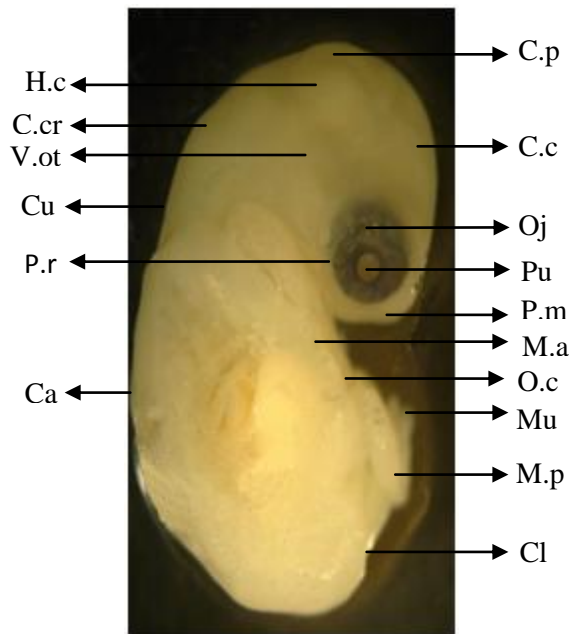


Figura 19. Formación del caparazón. (Ca) Caparazón; (C.c) Curvatura cefálica; (C.cr) Curvatura cervical; (C.p) Curvatura pontina; (Cl) Cloaca; (Cu) Cuello; (H.c) Hemisferios cerebrales; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (Mu) Muesca; (O.c) Ombligo Cutáneo; (Oj) Ojo; (P.m) Proceso mandibular; (P.r) Pigmentación retinal; (Pu) Pupila; (V.ot) Vesícula del otocisto.

ESTADIO IX: Formación de la mandíbula

Día 25 - 29

“Comprende desde la formación de la mandíbula hasta la formación del plastrón”

El embrión fijado a los 25 días se observa curvado en semicírculo sobre la esfera vitelina. La cabeza ya no es transparente. El proceso mandibular finaliza ya que se alcanza el extremo inferior del rostro por la mandíbula, el cual se muestra más achatado bajo un proceso naso frontal delineado. El ojo es de mayor tamaño y se presentan contracciones pupilares, se da inicio al esbozo del parpado. Solo el mielencéfalo es prominente y transparente. El cuello se ha alargado conservando su curvatura cervical y presenta varios pliegues. Posterior al cuello esta el caparazón el cual se encuentra definido anterior y posteriormente hasta más allá de la posición de los miembros posteriores; se observan escudos marginales lateralmente, esbozan una zona ovalada en todo el borde; el caparazón está deprimido en los flancos. El proceso de plastrón se ha iniciado y esboza primero su límite posterior, dejando libres las extremidades posteriores y el agujero del ombligo cutáneo. El tórax ensanchado, apenas deja ver el corazón delineado en la cavidad torácica. Las extremidades son articuladas, se han alargado y muestran interdigitaciones redondas en la placa palmar puntiaguda. El miembro anterior se dispone a lado y lado del tórax, como abrazándolo y los miembros posteriores se disponen igualmente

abrazando la base de la cola, la cual esta curvada continuando el semicírculo del cuerpo (Fig.20). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

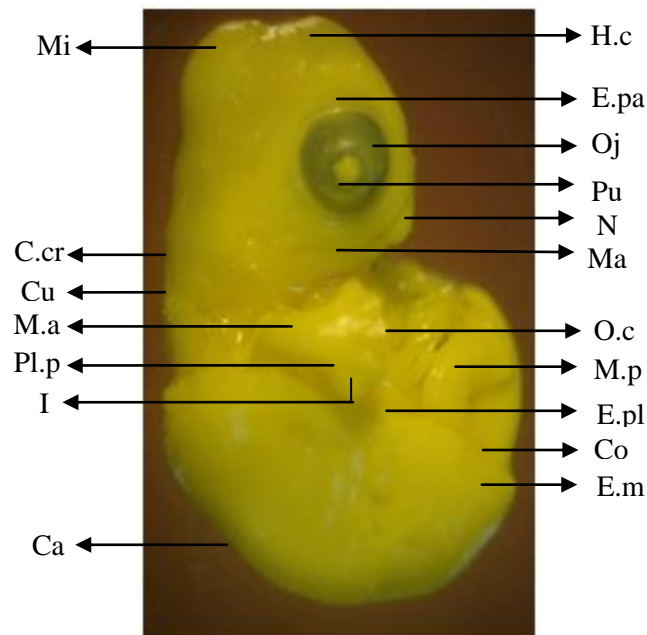


Figura 20. Formación de la mandíbula. (Ca) Caparazón; (C.cr) Curvatura cervical; (Co) Cola; (Cu) Cuello; (E.m) Escudo marginal; (E.pa) Esbozo del párpado; (E.pl) Esbozo del plastrón; (H.c) Hemisferios cerebrales; (I) Interdigitaciones; (Ma) Mandíbula; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (Mi) Mielencéfalo; (N) Narina; (O.c) Ombligo Cutáneo; (Oj) Ojo; (Pl.p) Placa Palmar; (Pu) Pupila.

ESTADIO X: Formación del plastrón

Día 30 - 34

“Comprende desde la formación del plastrón hasta la formación del puente”

El embrión fijado a los 30 días se observa ensanchado dorsalmente, en el caparazón se identifica la quilla. La cabeza toma la configuración propia de los reptiles, en el extremo rostral el proceso naso frontal es incipiente; la mandíbula es articulada y se ha perdido la transparencia craneal. Los escudos marginales ondulados y curvados delimitan el ovalo del caparazón, en cuya extensión las costillas son visibles como bandas blanquecinas. El plastrón ha completado su límite anterior dejando libres las extremidades anteriores, las cuales tienen más desarrollados los dedos se observa movimiento en las articulaciones; las fisuras corneas son muy delgadas y no se ha establecido la unión con el caparazón lo que dará origen al puente. Los miembros posteriores se ubican separados del plastrón abrazando la cola entre la región cloacal. La cola sigue curvada y la punta se encuentra arqueada. (Fig.21). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

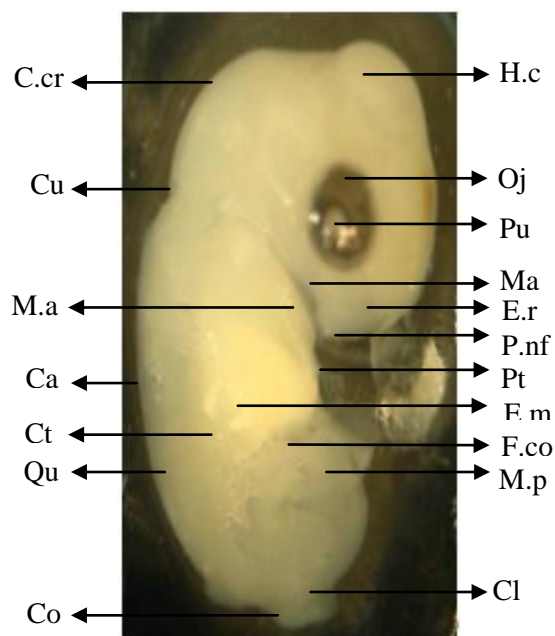


Figura 21. Formación del plastrón. (Ca) Caparazón; (C.cr) Curvatura cervical; (Cl) Cloaca; (Co) Cola; (Cu) Cuello; (Ct) Costillas; (E.m) Escudo marginal; (E.r) Extremo rostral; (F.co) Fisura cornea; (H.c) Hemisferios cerebrales; (Ma) Mandíbula; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (Oj) Ojo; (P.nf) Proceso naso frontal; (Pt) plastrón; (Pu) Pupila; (Qu) Quilla.

ESTADIO XI: Formación del puente

Día 35 - 39

“Comprende desde la formación del puente hasta la formación del cartilago”

El embrión fijado a los 35 días presenta movimientos nucales de lado a lado y movimientos de abertura y cierre de la boca. Los hemisferios cerebrales se encuentran en el cráneo el cual inicia un proceso cartilaginoso que los oculta parcialmente. Solo el ojo es prominente en la cabeza, con un proceso de parpado avanzado, el cual delimita la cavidad ocular por el parpado inferior. El rostro se ha ahusado y el extremo se observa puntiagudo. El borde de la boca se extiende hasta cerca del ojo y la articulación mandibular está bien establecida. En la boca se observa la carúncula, la cual sirve para romper el huevo durante la eclosión. El oído se encuentra de menor tamaño que la cavidad óptica. El cuello se ha alargado aun más y presenta pliegues dérmicos para la retracción nocal y angulación lateral. El caparazón ya no es transparente; la quilla se pronuncia más. Los bordes del caparazón se encuentran bien definidos, permiten contar 11 pares de escudos marginales características de los emídidos al igual que la presencia del escudo nocal y suprapigial. El plastrón se ha fusionado lateralmente con el caparazón formando el puente; las fisuras corneas dividen el plastrón en: entoplastrón

una sola placa, epiplastrón dos placas y xifiplastrón en dos placas. Las digitaciones de las extremidades ya han formado los dedos y se ven los esbozos de las uñas en los miembros anteriores y posteriores. La cola se acorta y ensancha (Fig.22). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

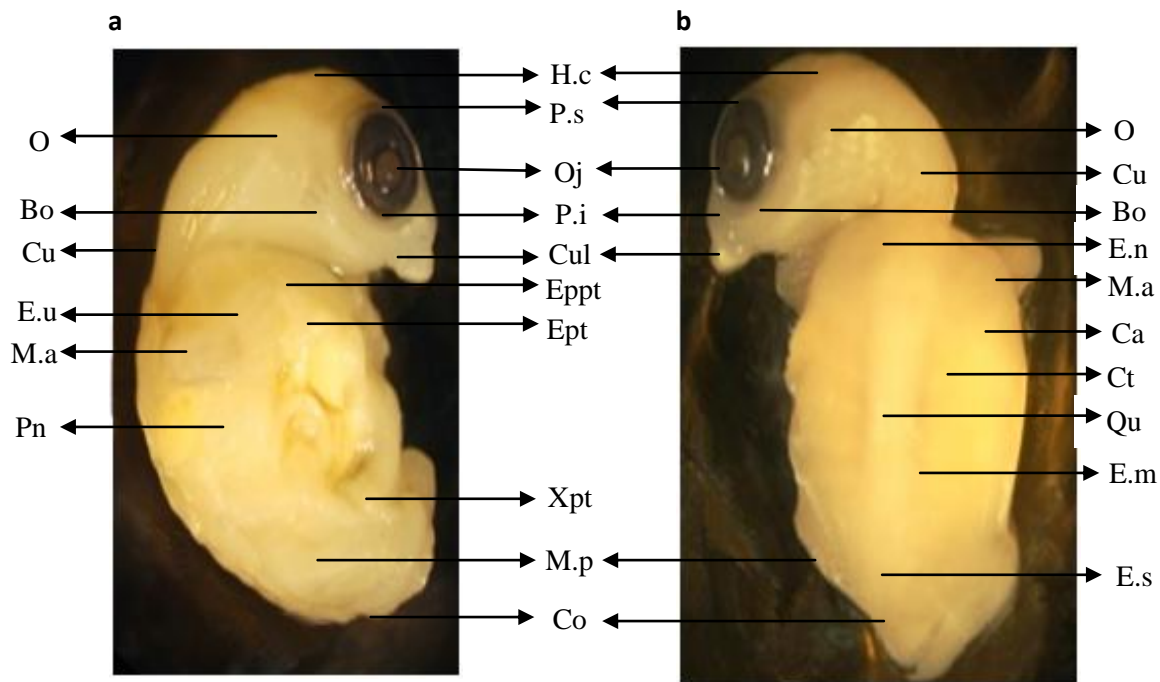


Figura 22. Formación del puente. 11.a Vista ventral. 11.b. Vista dorsal. (Bo) Boca; (Ca) Caparazón; (Co) Cola; (Ct) Costillas; (Cu) Cuello; (Cul) Carúncula; (E.m) Escudo marginal; (E.n) Escudo nucal; (Enpt) Entoplastrón; (Eppt) Epiplastrón; (E.u) Esbozo de uñas; (E.s) Escudo suprapigial; (H.c) Hemisferios cerebrales; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (O) Oído; (Oj) Ojo; (P.i) Parpado inferior; (Pn) Puente; (P.s) Parpado superior; (Qu) Quilla; (Xpt) Xifiplastrón.

ESTADIO XII: Proceso cartilaginoso

Día 40 - 44

“Comprende desde el proceso cartilaginoso hasta el inicio de la pigmentación corporal”

El embrión fijado a los 40 días se caracteriza por que su desarrollo externo esta completo, lo que da inicio a el proceso cartilaginoso, el cual le da más consistencia a la estructura del cuerpo; la configuración del cráneo cartilaginoso se ha establecido con la posición de los ojos, nariz (narina) y oídos de forma característica a la de los emídidos. Los parpados se encuentran formados y la proyección rostral se extiende delante de los ojos. La carúncula es un poco más grande. El cuerpo en general es todavía cartilaginoso. En el caparazón se han esbozado perfectamente los escudos vertebrales, costales y marginales; la superficie de las laminas del caparazón comienza a presentar rugosidades y la quilla se hace conspicua contribuyendo a determinar la altura primaria del cuerpo. El plastrón se muestra completamente configurado.

Las extremidades conservan una longitud de 1/3 del largo del caparazón con uñas perfectamente formadas. La cola más corta ahora que los miembros posteriores, los cuales se encuentra curvados en dirección de los escudos anales. El cuerpo ha tomado la fisionomía típica de un quelonio (Fig.23). Este estadio dura en promedio 4 días.

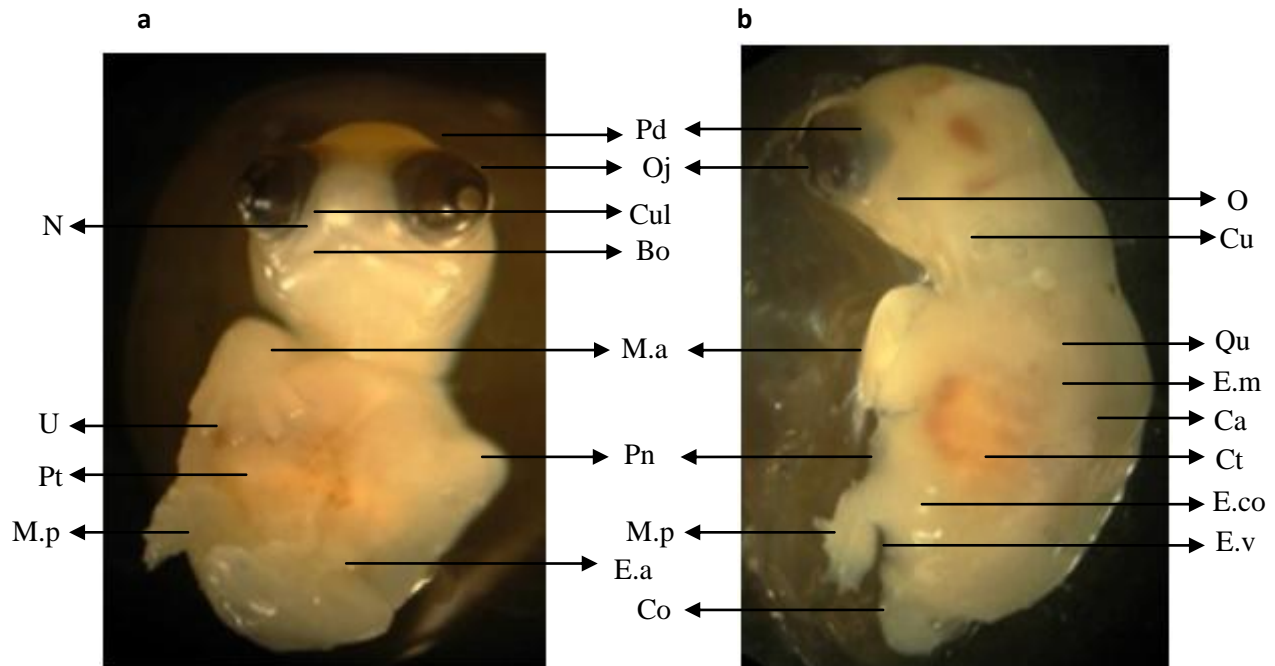


Figura 23. Formación del puente. 12.a Vista ventral. 12.b. Vista dorsal. (Bo) Boca; (Ca) Caparazón; (Co) Cola; (Ct) Costillas; (Cu) Cuello; (Cul) Carúncula; (E.a) Escudo anal; (E.co) Escudo costal; (E.m) Escudo marginal; (E.v) Escudo vertebral; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (N) Narina; (O) Oído; (Oj) Ojo; (Pd) Párpados; (Pn) Puente; (Pt) plastrón; (Qu) Quilla; (U) Uñas.

ESTADIO XIII: Pigmentación corporal

Día 45 - 49

“Comprende desde la pigmentación corporal hasta el inicio del proceso de osificación”

El embrión fijado a los 45 días se reconoce ya que este adquiere una pigmentación verde oscura en el caparazón y en el plastrón una coloración blanca. La carúncula se observa como una prominencia blanca en el extremo frontal. La boca está bien desarrollada y los extremos mandibulares alcanzan sus límites. El cuello esta techado con pliegues dérmicos y presenta el movimiento nuczal lateral. El caparazón es totalmente ovalado, presenta una pequeña quilla entre el segundo y el tercer escudo marginal. En el caparazón se observan 2 pares de estos escudos. El plastrón no ha variado. Los miembros se han elongado con la osificación del cubito y del radio a los que se articulan los 5 dedos largos delgados con uñas. La cola está muy

reducida en longitud, tiene mayor grosor, está cubierta de escamas y se curva en dirección contraria a la de la cabeza, llegando hasta el segundo escudo vertebral inferior y deja ver el abultamiento cloacal (Fig.24). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

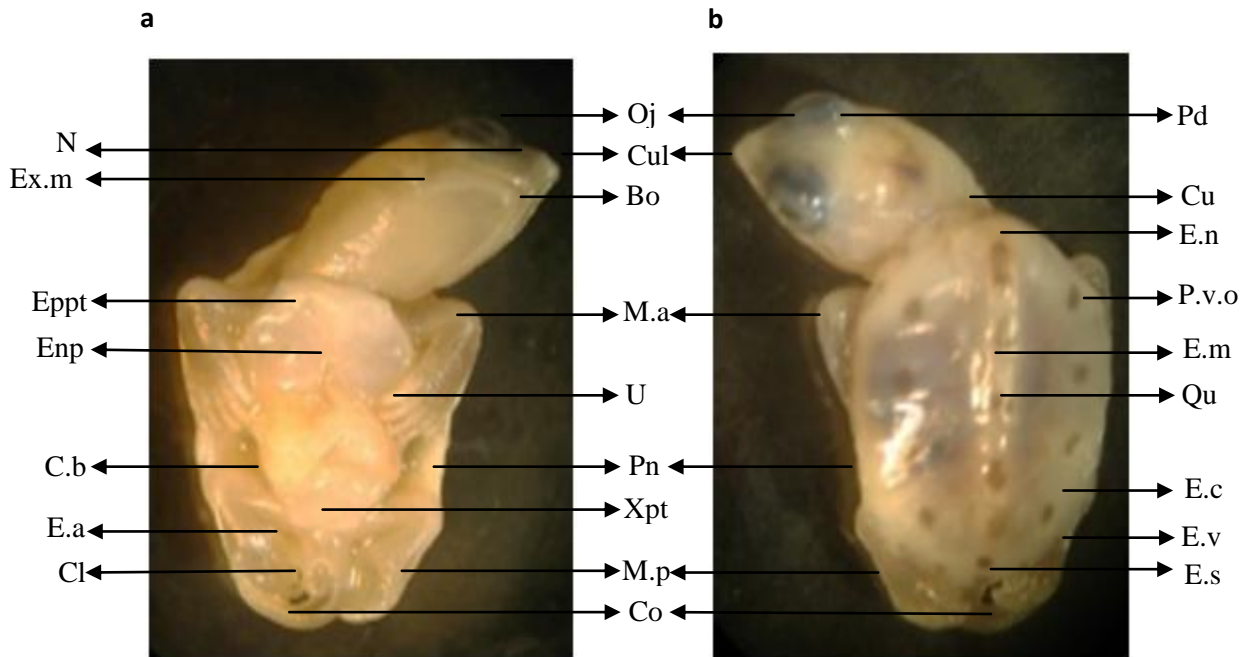


Figura 24. Pigmentación corporal. 13.a Vista ventral. 13.b. Vista dorsal. (Bo) Boca; (C.b) Coloración blanca; (Cl) Cloaca; (Co) Cola; (Cu) Cuello; (Cul) Carúncula; (E.a) Escudo anal; (E.co) Escudo costal; (E.m) Escudo marginal; (E.n) Escudo nucal; (Enp) Entoplastrón; (Eppt) Epiplastrón; (E.s) Escudo suprapigial; (E.v) Escudo vertebral; (Ex.m) Extremos mandibulares; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (N) Narina; (Oj) Ojo; (Pd) Párpados; (P.v.o) Pigmentación verde oscura; (Pn) Puente; (Qu) Quilla; (U) Uñas; (Xpt) Xifiplastrón.

ESTADIO XIV: Proceso de osificación

Día 50 - 54

“Comprende desde el proceso de osificación hasta el inicio del proceso corneo”

El embrión fijado a los 50 días se reconoce por que inicia el proceso de osificación de las arcos mandibulares, la columna vertebral, las costillas, el extremo caudal, el entoplastrón, los bordes de los escudos anales y el centro de los huesos (húmero peroné, fémur y tibia). El proceso óseo se completa en la bóveda cefálica y en las falanges de los miembros. En el plastrón se inicia la formación del hioplastrón y del hipoplastrón. En el caparazón están más diferenciados los escudos costales, marginales y vertebrales (Fig.25). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

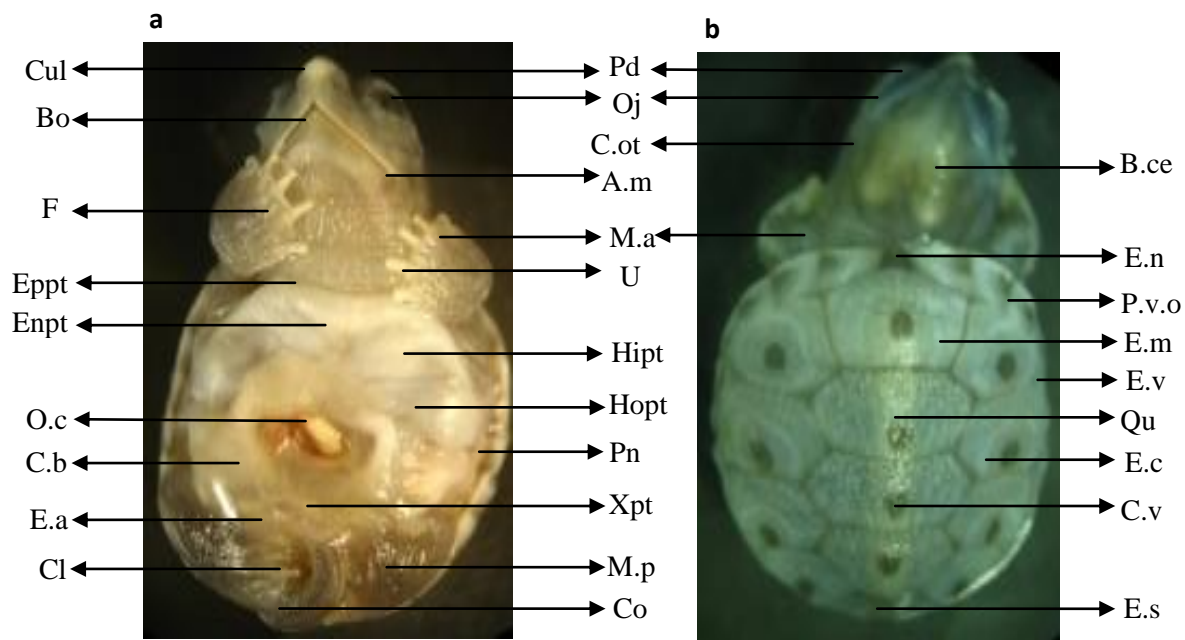


Figura 25. Proceso de osificación. 14.a Vista ventral. 14.b. Vista dorsal. (A.m) Arco mandibular; (B.ce) bóveda cefálica; (Bo) Boca; (C.b) Coloración blanca; (Cl) Cloaca; (Co) Cola; (Cul) Carúncula; (C.v) Columna vertebral; (E.a) Escudo anal; (E.co) Escudo costal; (E.m) Escudo marginal; (E.n) Escudo nucal; (Enpt) Entoplastrón; (Eppt) Epiplastrón; (E.s) Escudo suprapigial; (E.v) Escudo vertebral; (F) Falange; (Hipt) Hioplastrón; (Hopt) Hipoplastrón; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (O.c) Ombligo Cutáneo; (Oj) Ojo; (Pd) Párpados; (P.v.o) Pigmentación verde oscura; (Pn) Puente; (Qu) Quilla; (U) Uñas; (Xpt) Xifiplastrón.

ESTADIO XV: Proceso corneo

Día 55 - 60

“Comprende desde el inicio del proceso corneo hasta la eclosión”

El embrión fijado a los 55 días se caracteriza por que el caparazón y el plastrón adquieren la pigmentación característica de la subespecie, el cuerpo tiene mayor consistencia debido a que ya ha finalizado la osificación. El proceso corneo consiste en endurecer con queratina estructuras como la carúncula, el borde mandibular, las uñas y el caparazón por el borde y en la quilla (Fig.26). Este estadio dura en promedio 3 días y 10 horas.

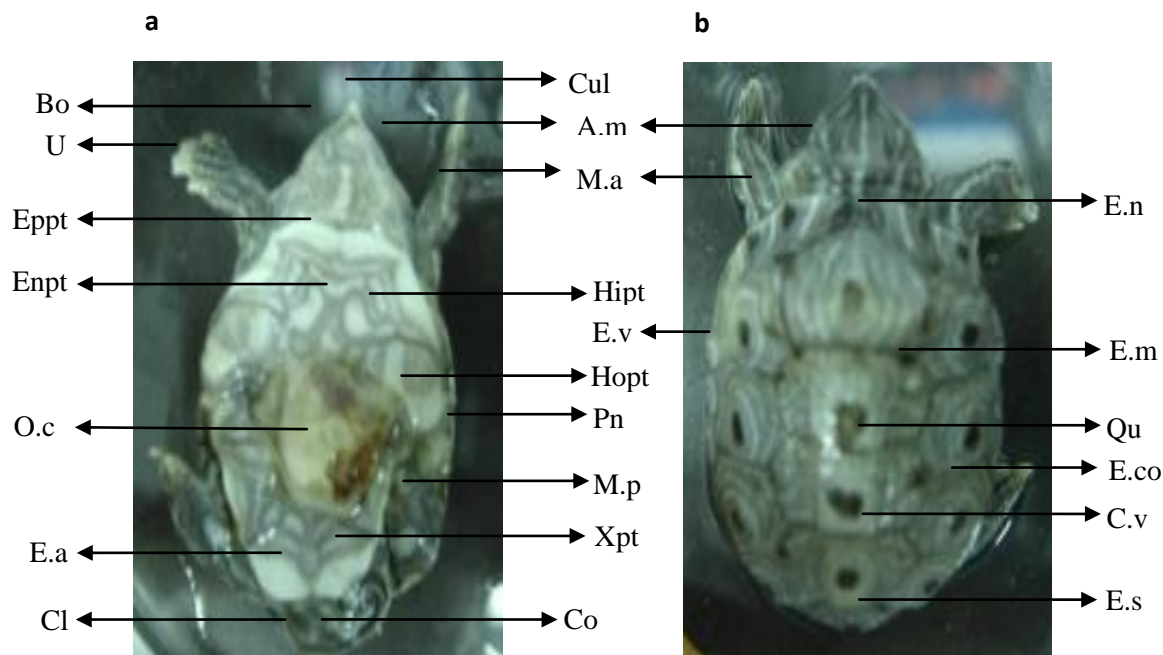


Figura 26. Proceso de corneo. 15.a Vista ventral. 15.b. Vista dorsal. (A.m) Arco mandibular; (Bo) Boca; (Cl) Cloaca; (Co) Cola; (Cul) Carúncula; (C.v) Columna vertebral; (E.a) Escudo anal; (E.co) Escudo costal; (E.m) Escudo marginal; (E.n) Escudo nual; (Enpt) Entoplastrón; (Eppt) Epiplastrón; (E.s) Escudo suprapigial; (E.v) Escudo vertebral; (Hipt) Hioplastrón; (Hopt) Hipoplastrón; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (O.c) Ombliigo Cutáneo; (Pn) Puente; (Qu) Quilla; (U) Uñas; (Xpt) Xifiplastrón.

ESTADIO XVI: Eclosión

Día 60 - 70

“Comprende desde la eclosión hasta la total reabsorción del vitelo”

El embrión fijado a los 60 días ha desarrollado el patrón de manchas en la cabeza y del borde el caparazón, además ha desarrollado escamas de las patas; en este periodo del desarrollo sucede la eclosión de neonatos en los cuales no se ha completado la reabsorción del vitelo (ombliigo). Observándose el saco vitelino a nivel umbilical. La coloración del caparazón es verde con manchas de color negro y la del plastrón es gris con verde claro, la de la piel es verde oscura aunque más oscura en la región cefálica (Fig.27). Este estadio dura en promedio 10 días y 52 minutos.

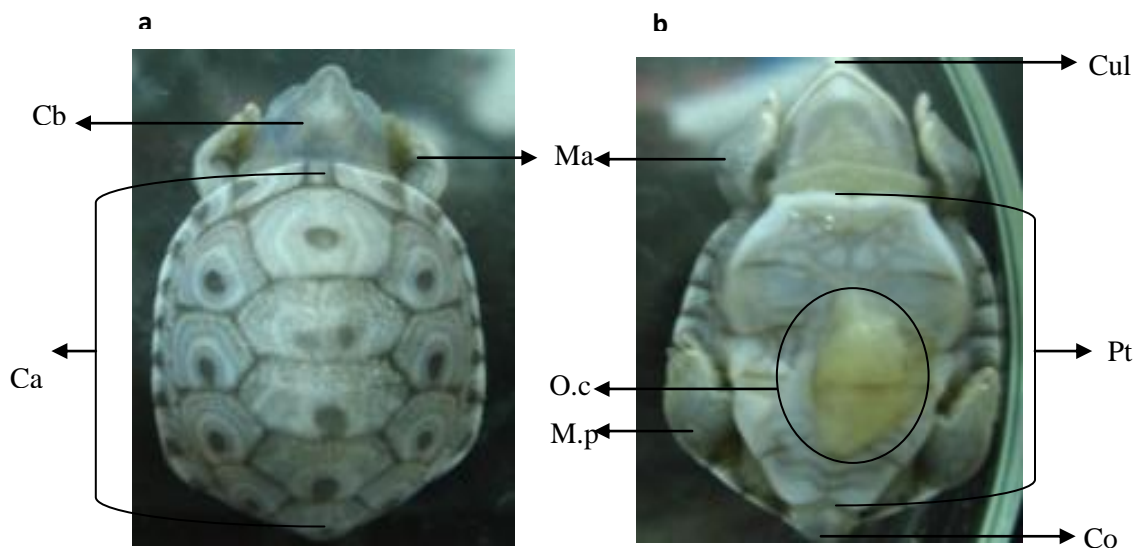


Figura 27. Eclosión. 16.a Vista ventral. 16.b. Vista dorsal. (Ca) Caparazón; (Cb) Cabeza; (Co) Cola; (Cul) Carúncula; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (O.c) Ombiligo Cutáneo; (Pt) plastrón.

Los tiempos presentados en la Tabla 1, permiten establecer una aproximación de la duración en horas de cada estadio, el promedio de cada estadio en horas y días, el tiempo acumulado en días, el coeficiente de variación y la desviación estándar.

Tabla 1. Tiempo netos para los estadios de desarrollo embrionario de *Trachemys callirostris callirostris*

	Estadio	Promedio (horas)	Días	Tiempo acumulado (días)	coeficiente de variación	Desviación estándar
I	Disco embrionario	69	2,875	0	0,03	1,83
II	Curvatura cefálica	10	0,417	2,875	0,08	0,82
III	Curvatura cervical	9,75	0,406	3,29	0,10	0,96
IV	Curvatura pontina	22,25	0,927	3,70	0,04	0,96
V	Formación de las tres cámaras del corazón	95,25	3,969	4,63	0,01	0,96
VI	Esbozo de la mandíbula	95,5	3,979	8,59	0,02	2,08
VII	Crecimiento de las extremidades en forma de “bala”	95,75	3,990	12,57	0,01	1,26
VIII	Formación del caparazón	95,5	3,979	16,56	0,02	2,08
IX	Formación de la mandíbula	93,75	3,906	20,54	0,02	1,71
X	Formación del plastrón	95,25	3,969	24,45	0,01	0,96
XI	Formación del puente	95,5	3,979	28,42	0,03	2,52
XII	Proceso cartilaginoso	96	4,000	32,40	0,02	1,63
XIII	Pigmentación corporal	95,5	3,979	36,40	0,02	2,08
XIV	Proceso de osificación	95,75	3,990	40,38	0,02	1,71
XV	Proceso corneo	95,75	3,990	44,36	0,01	1,26
XVI	Eclosión	241,25	10,052	48,35	0,04	8,54
		1401,75		58,41		

10. Discusión

La tabla de desarrollo embrionario elaborada en fases normales permite comparar a la Hicotea (*Trachemys callirostris callirostris*) con otras especies de quelonios; las comparaciones entre diferentes taxones se realizaron tomando como criterio morfológico macroscópico la formación del miembro anterior, ya que es el carácter principal utilizado para la construcción de estadios equivalentes y relaciones filogenéticas entre las especies, sin embargo las características de la morfología del ojo, del caparazón, y la pigmentación del cuerpo, en orden decreciente de importancia, también se emplearon (Greenbaum, 2002); siendo estos criterios desde el ojo hasta la pigmentación organizados de acuerdo al tiempo de aparición y crecimiento en el embrión a lo que se le denomina heterocronía (Werneburg, 2009).

Estas características fueron elegidas porque se pueden comparar fácilmente a través de los taxones teniendo en cuenta el tiempo de aparición durante la embriogénesis de cada una de las especies empleadas, logrando establecer las diferencias entre el desarrollo de los taxones como resultado de las descripciones de carácter realizados por cada autor (Werneburg, 2009). Sin embargo estas comparaciones cuantifican las características normales del desarrollo embrionario de *Trachemys callirostris callirostris* y su importancia radica en aportar una información esencial como patrón de referencia para futuras investigaciones.

Para realizar dichas comparaciones se tuvo en cuenta las tablas de desarrollo descritas para las siguientes especies, *C. serpentina* (Yntema, 1968), *P. expansa* (Mora, 1985) *P. sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001), *T. scripta* (Greenbaum, 2002) y *A. pinífera* (Greenbaum & Carr, 2002), todas fueron descritas con 27 estadios a excepción de Mora (1985) la cual describió su especie en 14 estadios, la variación en el número de estadios dependen de los criterios elegidos por los investigadores (Guevara, 1997); además se tuvo en cuenta el tiempo total de desarrollo de cada especie, ya que de este factor depende del inicio de la formación de diferentes estructuras durante la organogénesis (Werneburg, 2009); de acuerdo a esto el tiempo de desarrollo para *C. serpentina*, *T. scripta* y *A. pinífera* fue de 140 días, mientras que en *P. expansa* y *P. sinensis* el desarrollo duró 60 y 48 días respectivamente. La temperatura es el factor abiótico que mayor influencia tiene durante el desarrollo embrionario ya que puede retrasar o acelerar el crecimiento, debido a que cada especie tiene un rango óptimo de temperatura para su desarrollo (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007), de acuerdo a lo anterior la temperatura en la cual se elaboro la tabla de desarrollo para *P. expansa* y *T. scripta* fue de 27°C mientras que en *C. serpentina*, *P. sinensis* y *T. c. callirostris* fue de 30°C a diferencia de *A. pinífera* cuya tabla se elaboro a 31°C, estas diferencias en la temperatura posiblemente son

la causa por la cual las diferentes estructuras y órganos se forman primero en unas especies que en otras. Se observó una diferencia entre el tiempo total de desarrollo para *T. c. callirostris* (58 días) y *T. scripta* (140 días), teniendo en cuenta que pertenecen a la misma familia (Emydidae) se ha registrado que el tiempo promedio de desarrollo entre las especies y subespecies pertenecientes a esta familia es de 60 días (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007), esta variación posiblemente se debe a los rangos de temperatura en los cuales se elaboraron las tablas de desarrollo.

Tomando como referencia los 16 estadios de *T. c. callirostris* descritos en 58 días (tiempo total de desarrollo), las etapas previas al estadio IV de la Hicotea se asemejan al desarrollo embrionario de estas especies de tortugas en las primeras etapas, ya que describen la formación del disco germinal y de la placa primitiva principalmente.

El miembro anterior sigue un patrón general de desarrollo para todas las especies comparadas en este estudio; el cual inicia con la formación de un esbozo, luego el alargamiento de este en forma de bala, permitiendo así la aparición de la membrana interdigital y finalmente el desarrollo de dedos y uñas con lo cual concluye este proceso de crecimiento embrionario; estos cambios inician y finalizan aproximadamente entre la segunda y la tercera parte del desarrollo embrionario para todas las especies, lo cual depende de su tiempo total de desarrollo. En *T. c. callirostris* se observa su esbozo o primordio a los 4 días (estadio IV) mientras que en *P. expansa* (Mora, 1985) sucede a los 10 días, luego a los 12 días se observa en *P. sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001) y finalmente se describió para *C. serpentina* (Yntema, 1968), *T. scripta* (Greenbaum, 2002) y *A. pinífera* (Greenbaum & Carr, 2002) en el día 16 de su desarrollo; estos tiempos son la principal diferencia en la aparición del miembro anterior, ya que el tiempo total de desarrollo es diferente para cada una de las especies comparadas, sin embargo el desarrollo de *C. serpentina* (Yntema, 1968), *T. scripta* (Greenbaum, 2002) y *A. pinífera* (Greenbaum & Carr, 2002) dura 140 días lo cual es el doble de tiempo aproximadamente con relación al desarrollo de la Hicotea que dura en promedio 58 días; en cuanto a su similitud se asocia esta característica a la aparición y formación de la vesícula ótica en todas las especies, sin embargo para la Hicotea, *C. serpentina* (Yntema, 1968), *T. scripta* (Greenbaum, 2002) y *A. pinífera* (Greenbaum & Carr, 2002) se describe la formación de los arcos faríngeos los cuales también se asocian a la formación del miembro anterior.

En el estadio II de la Hicotea (3 días) su desarrollo se caracteriza por presentar la curvatura cefálica y el esbozo del corazón principalmente, estas estructuras se asocian con el inicio de la formación de la vesícula óptica de la cual se diferencia la cúpula óptica, estas mismas características se describieron en el día 6 del desarrollo para *P. expansa* (Mora, 1985) y en el día 3 para *P. sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001), a diferencia de *C. serpentina* (Yntema, 1968), *T. scripta* (Greenbaum, 2002) y *A. pinífera* (Greenbaum & Carr, 2002) en las cuales se reporto en el día 7, en estas tres últimas especies la diferenciación de la vesícula óptica está relacionada con otras estructuras como la formación del arco mandibular y 8 pares de somitas, debido a los criterios escogidos por los investigadores (Guevara, 1997); en estas seis especies se describió la formación del arco mandibular y como este al iniciar el proceso mandibular se encuentra relacionado con el crecimiento del ojo, ya que estas dos estructuras van desarrollándose en simultanea y en el momento en que el proceso mandibular alcanza el nivel del ojo, se ha completado la formación de este órgano de los sentidos.

Las tortugas se caracterizan por presentar un caparazón que recubre y protege sus órganos internos (Castaño-Mora & Medem, 2002), esta estructura inicia su diferenciación con el inicio de la formación de los pliegues dérmicos los cuales dan origen al esbozo del caparazón como sucede en la Hicotea en el estadio VIII a los 20 días de desarrollo y en *P. sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001), además se asocia con la formación de la cloaca y la presencia de las tres curvaturas (cervical, cefálica y pontina), en las otras especies de tortugas se asocia la aparición del caparazón con la completa formación del ojo como sucede en *C. serpentina* (Yntema, 1968) y *P. expansa* (Mora, 1985) a los 20 y 30 días respectivamente; caso contrario ocurre en *A. pinífera* a los 45 días de desarrollo, ya que los autores no asocian la formación del caparazón con algún órgano sino con dos curvaturas la cefálica y la pontina (Greenbaum & Carr, 2002). Cuando esta completa la formación del caparazón se inicia la división de este para formar los escudos o placas (característicos para cada especie), posterior a esto se da inicio a la pigmentación del caparazón y del cuerpo (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007), en *C. serpentina* (Yntema, 1968) y *T. scripta* (Greenbaum, 2002) ocurre en la mitad del tiempo de desarrollo, mientras que en *T. c. callirostris*, *P. expansa* (Mora, 1985), *P. sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001) y *A. pinífera* (Greenbaum & Carr, 2002) se forma dos semanas antes de finalizar el periodo embrionario, esto depende del patrón de coloración el cual es similar para las especies pero único para cada individuo (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007).

Se realizaron comparaciones histológicas con embriones de pollo (*Gallus gallus*) y cerdo (*Sus Scrofa*) por la falta de información y estudios realizados a nivel histológico, debido a que la mayoría de tablas de desarrollo se realizan solamente a nivel macroscópico. Al realizar el estudio de los embriones de tortuga mediante cortes histológicos transversales, fue evidente la similitud de los primeros estadios (II al IV), con el desarrollo embrionario de *Gallus gallus* descrito por Hamburger & Hamilton (1951) en los estadios de 27 a 36 pares de somitas; mientras que los estadios siguientes (V al VII) fueron similares al desarrollo embrionario de *Sus Scrofa* en el estadio en el cual tiene 10 milímetros de longitud (Patten, 1944). La cabeza y el cuello de la tortuga forman la curvatura cervical que lleva al telencéfalo cerca del corazón en el estadio III y IV, como ocurre en el embrión de cerdo en el estadio de 10 milímetros y en el embrión de pollo con 36 pares de somitas (Patten, 1944; Hamburger & Hamilton, 1951).

Al observar un embrión de pollo de 27 pares de somitas y los embriones de tortuga del estadio II, podemos ver que en ambos casos se presenta un área vascular alrededor del embrión; en la región cefálica se delimitan las cinco vesículas secundarias; el corazón es prominente en ambos casos, situando la aurícula hacia delante y los ventrículos hacia atrás; se forma el seno venoso como una primera sección del corazón que recibe la sangre de las venas vitelinas y el bulbo arterioso conduciéndola a la aorta (Hamburger & Hamilton, 1951). Los estadios III y IV de la Hicotea son muy similares al embrión de pollo con 36 pares de somitas por las estructuras que presenta (hígado, estomago, arcos faríngeos y aórticos, surco laringotraqueal entre otros); al cumplir 20 días el embrión de tortuga presenta variación en cuanto a la aparición del caparazón que conlleva a cambios en el cuerpo del embrión, ya que este empieza a crecer en plano horizontal y no en el dorso ventral como ocurre en aves y mamíferos (Hildebrand, 1982). Este crecimiento en plano horizontal puede ser por la expresión de genes altamente conservados de la caja homeótica (Smith, 2003), los cuales codifican para factores de transcripción que a su vez activan cascadas de genes HOX para regular la formación de los ejes antero- posteriores que delimitan el crecimiento horizontal en quelonios (Sadler, 2007).

La formación y desarrollo de estructuras es muy semejante en todos los vertebrados, al hacer una comparación de las tortugas con el desarrollo embrionario de aves y mamíferos es evidente que este va variando de acuerdo a cada especie, pero siempre sigue un patrón general que determina la ontogénesis de cada individuo (Werneburg, 2009).

11. Conclusiones

El presente trabajo permitió describir cómo es el desarrollo embrionario de *Trachemys callirostris callirostris*, estableciendo un total de 16 estadios; los primeros 7 fueron descritos macroscópicamente e histológicamente y a partir del 8 fueron descritos solo macroscópicamente.

La mayoría de las estructuras externas se diferencian entre la hora 72 y el día 15, ya que se forman órganos fundamentales como el corazón, hígado y sistema digestivo además de estructuras importantes como la columna vertebral, los hemisferios cerebrales y la red sanguínea, por lo cual en este periodo de tiempo se convierte en los estadios más vulnerables del desarrollo.

Los cortes histológicos transversales realizados a los embriones de la Hicotea evidencian su similitud en los primeros estadios (II al IV) con el desarrollo embrionario de *Gallus gallus*, mientras que los estadios siguientes (V al VII) son similares al desarrollo embrionario de *Sus Scrofa*, debido a las estructuras que se diferencian en estos estadios.

Las características macroscópicas en los estadios II al VII presentan aparentemente un menor desarrollo de las estructuras identificadas con relación a lo observado en los cortes histológicos, ya que estos presentan un mayor grado de crecimiento y diferenciación en sus estructuras.

El tiempo promedio total del desarrollo de *Trachemys callirostris callirostris* desde la ovoposición hasta la eclosión fue de 1401.75 horas equivalente a 58.4 días, a una temperatura constante de 30°C.

La temperatura de incubación reportadas en las tablas de desarrollo de *T. c. callirostris* (30°C) y *T. scripta* (27°C) (Greenbaum, 2002) generan un mayor tiempo de incubación por lo tanto el desarrollo se retrasa.

Con este trabajo se elaboro una guía de carácter práctico que permite reconocer, sin necesidad de una amplia formación previa en embriología, el grado de maduración en el que se encuentra un embrión de *Trachemys callirostris callirostris* mediante caracteres anatómicos macroscópicos.

12. Recomendaciones

Realizar un estudio que permita la identificación del estadio adecuado para el traslado de nidos a condiciones controladas de temperatura y humedad para fomentar la zootecnia de esta subespecie.

Efectuar estudios a nivel molecular que permitan establecer relaciones filogenéticas entre las especies a partir de las características embrionarias de cada tabla de desarrollo.

Evaluar que incidencia tienen las fluctuaciones de temperatura ambiental en el tiempo de desarrollo de los quelonios.

13. Bibliografía citada

- Arzola, J.F. 2007. Humedad y temperatura en nidos naturales y artificiales de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz 1829). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol 42 (3). pp 377-383.
- Balinsky, B.I & B.C. Fabian. 1983. *Introducción a la embriología*. Ediciones Omega, S.A. Platón, Barcelona. pp 727.
- Bernal, M. Daza, J. Páez, V. 2004. Ecología reproductiva y cacería de la tortuga *Trachemys scripta* (Testudinata: Emydidae), en el área de la Depresión Momposina, norte de Colombia. *Revista de Biología Tropical*. Vol 52. pp 229- 238.
- Bouchot. 1965. La placentation chez les reptiles. *Année biologique*. Vol 4. pp 547-571.
- Box, G. Hunter, J. Hunter, W. 2008. Segunda edición. *Estadística para investigadores diseño, innovación y descubrimiento*. Editorial Reverté. España. pp 627.
- Boyer D.R. 1965. Ecology of the basking habit in turtles. *Journal of environmental management*. Vol 46. pp 99-118.
- Bull, J. J. 1980. Sex determination in reptiles. *The Quartelry Review of Biology*. Vol 55. pp 3-20.
- Bull, J. & Vogt, R. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtles. *Journal of Experimental Zoology*. Vol 218. pp 435-440.
- Castaño-Mora, O.V. 1997. Status of the tortoises and freshwater turtles of Colombia. *Conservation, Restoration and Management of Tortoises and Turtles*. In J. Van Abbema (ed.). An International Conference. New York Turtle and Tortoise Society, Nueva York, Estados Unidos. pp 302-306.
- Castaño Mora O.V & F. Medem. 2002. *Libro rojo de reptiles de Colombia*. Serie Libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto de ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia. Bogotá. pp 160.
- CDB. 2007. *Cambio Climático y Diversidad Biológica*. Día internacional de la diversidad biológica. pp 48.
- Chipman, A.D. 2002. Variation, plasticity and modularity in anuran development. *Zoology*. Vol 105. pp 97-104.
- Daza, J. M & Paes, V.P. 2007. Morphometric variation and its effect on reproductive potential in female Colombian slider turtles (*Trachemys callirostris callirostris*). *Herpetologica*. Vol 63. pp 125-134.

- De La Ossa-Velásquez, J. & Botero, A. L. 2003. Guía para la cría, manejo y aprovechamiento de algunas especies animales promisorias y otras domesticas. Convenio Andrés Bello. Ciencia y tecnología. Bogotá, Colombia. pp 120.
- De La Ossa-Velásquez, J. & Riaño, S. R. 1999. Guía para el manejo, cría y conservación de la Hicotea o jicotea *Trachemys scripta callirostris* (Gray). Convenio Andrés Bello. Ciencia y tecnología. Bogotá, Colombia. pp 40.
- Ewert, M. & Nelson, C. 1991. Sex determination in turtles: patterns and some possible adaptive values. pp 50-69.
- Ewert, M. Etchberger, C. & Nelson, C. 2004. Turtle sex-determining modes and TSD patterns, and some TSD pattern correlates. Smithsonian Institution Press. Washington, DC. pp 21-32.
- Eynard, A. Valentich, M. Rovasio, R. 2008. Cuarta edición. Histología y Embriología del Ser Humano bases celulares y moleculares. Ed. Médica Panamericana. Bogotá, Colombia. pp 696.
- Fals-Borda, O. 1984. Los hombres Hicote y la resistencia popular. Historia doble de la costa 3. Carlos Valencia Editores. Bogotá.
- Fox, H. 1977. The urogenital system of reptiles. Biology of the reptiles. Vol 6. pp 1-157.
- Gibbons, J. W. & Greene, J. L. 1990. Reproduction in the slider and other species of turtles. Pp. 124-134. En: Gibbons, J. W., Life history and ecology of the slider turtle. Smithsonian institution press. Washington D. C. pp 334.
- Gilbert, S.F. 2005. Séptima Edición. Biología del desarrollo. Ed. Médica Panamericana. Bogotá, Colombia. pp 881.
- Gray, J. 1855. Catalogue of shield reptiles in the collection of the British museum. Part I. Testudinata (tortoises). Taylor and Francis, London.
- Greenbaum, E. 2002. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. Canadian Journal of Zoology. Vol 80. pp 1350-1370.
- Greenbaum, E. & Carr, J. 2002. Staging Criteria for Embryos of the Spiny Softshell Turtle, *Apalone spinifera* (Testudines: Trionychidae). Journal of morphology. Vol 254. pp. 272–291.
- Guevara, E. 1982. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Trabajo de grado (Bióloga). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Guevara, E. 1997. Estudio embrionario y larval, macroscópico e histológico de *Betta Splendens* (Regan, 1909). Bióloga. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. Laboratorio de Biología del Desarrollo. Bogotá.

- Gutiérrez, J.C. 2005. Las santas carnes de las tortugas del Magdalena. Vanguardia liberal-Bucaramanga, Santander.
- Hamburger, V. & Hamilton, H. L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*. Vol 88. pp. 49-92.
- Hernández. C., J., & H. Sánchez. 1992. Biomas terrestres de Colombia. la diversidad biológica de Iberoamérica. *Acta zoológica mexicana*. pp 153-174.
- Hildebrand, M. 1982. Anatomía y embriología de los vertebrados. Mexico. Limusa. pp. 844.
- Holley, S.A. 2006. Anterior – posterior differences in vertebrate segments: specification of trunk and tail somites in the zebrafish blastula. *Genes & Development* 20. pp. 1831 – 1837.
- Jeffery, J. Bininda-Emonds, O. Coates, M. Richardson, M. 2005. A new technique for identifying sequence heterochrony. *Systematic Biology* . Vol 54. pp 230–240.
- Martínez, M. L. 1994. Estudio embrionario y larval, macroscópico e histológico de *Aquidens pulcher* (Gill, 1858). Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- MAVDT-UNAL. 2009. Plan de manejo orientado al uso sostenible de la Hicotea en Colombia. Imprenta nacional de Colombia. pp 76.
- Medem, F. 1975. La reproducción de la icotea, *Pseudemys scripta callirostris* (Testudines, Emydidae). *Caldasia* Vol 11. pp 83-106.
- Mitgutsch, C. Olsson, L. & Haas, A. 2009. Early embryogenesis in discoglossoid frogs: a study of heterochrony at different taxonomic levels. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. Vol 47. pp 248-257.
- MMA.2002. Programa nacional para la conservación de las tortugas marinas y continentales en Colombia. Dirección general de ecosistemas. Imprenta nacional de Colombia. pp 63.
- Mora, M. 1985. Descripción del desarrollo embrionario en condiciones naturales de la tortuga charapa (*Podocnemis expansa*) Testudinata: Pelomedusidae, en el río Caquetá. Trabajo de grado (Bióloga). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Palacios, R., I. D., Bakker, J. T., Guevara V., A. 1999. Tráfico y aprovechamiento de la iguana e Hicotea en la zona Caribe de Colombia. *Latin American environmental society*. Bogotá, Colombia.
- Patten, B. 1944. The embryology of the pig. Philadelphia the Blakiston Company. pp. 327.
- Piñeros J., V. 2004. Ecología reproductiva de la tortuga *Trachemys callirostris callirostris* (Testudines: Emydidae) en una localidad de la depresión Monposina, Colombia. tesis de pregrado, facultad de biología marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. pp 118.

- Restrepo, A., Piñeros, V.J & Páez, V. P. 2007. Características reproductivas de la tortuga *Trachemys callirostris callirostris* (Testudines: Emydidae) en Isla León, Depresión Momposina, Colombia. *Caldasia*. Vol 29. pp 283-295.
- Rhen, T. & Lang, J. 2004. Phenotypic Effects of Incubation Temperature in Reptiles. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. pp.90-98.
- Rhodin, A. G. J., Dijk, P. P van & Parham, J: F: 2008. Turtles of the world: Annotated checklist of taxonomy and synonymy. *Conservation Biology of freshwater and tortoises research monographs*. No.5: 000.1-000.38.
- Rueda-Almonacid, J.V., J. L. Carr, R. A. Mittermeier, J. V. Rodríguez-Mahecha, R. B. Mast, R. C. Vogt, A. G. J. Rhodin, J. de la Ossa-Velásquez, J. N. Rueda & C. G. ttermeier. 2007. Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo N° 6. Conservación Internacional. Editorial Panamericana, Formas e Impresos. Bogotá, Colombia. pp 538.
- Sadler, T. 2007. Langman Embriología medica con orientación clínica. Editorial medica panamericana. Bogotá, Colombia. pp 386.
- Simmons, J.E. 1995. Storage in fluid preservatives. *In Storage of natural history collections: a preventive conservation approach*. Edited by C.L. Rose, C.A. Hawks, and H.H. Genoways. Society for the Preservation of Natural History Collections, Iowa City, Iowa. pp. 161-186.
- Smith, K. 2003. Time's arrow: heterochrony and the evolution of development. *International journal of developmental biology*. Vol. 47. pp 613-621.
- Tokita, M. & Kuratani, S. 2001. Normal Embryonic Stages of the Chinese softshelled Turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoological science*. Vol 18. pp. 705- 715.
- Vogt, R. 1994. Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. *Chelonian Conservation and Biology* 1. Vol 2. pp 159-162.
- Walsh, P.T., Downie, J.R., Monaghan, P. 2008. Temperature mediated morphology changes during metamorphic climax in the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Journal of Thermal Biology*. Vol 33. pp 244-249.
- Werneburg, I. 2009. A Standard System to Study Vertebrate Embryos. *Plos one*. Vol 4. pp 1–16.
- Wise, P. M. Vickaryous, A. Russell. 2009. An Embryonic Staging Table for In Ovo development of *Eublepharis macularius*, the Leopard Gecko. *The anatomical record*. Canada. Vol 292. pp 1198–1212.
- Yntema, C. & Mrosovsky, N. 1982. Critical periods and pivotal temperature for sex determination in loggerhead sea turtles. *Cand. J. Zool*. Vol 60. pp 1012-1016.
- Yntema, C.L. 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology*. Vol 125. pp 219-251.