

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO DE
LINFOCITOS DE LA TORTUGA CABEZONA *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758)
PARA LA OBTENCIÓN DE CARIOTIPOS**

ELLIE ANNE LÓPEZ BARRERA

**UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE BIOLOGIA MARINA
BOGOTA D.C.**

2005

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO DE
LINFOCITOS DE LA TORTUGA CABEZONA *Caretta caretta* (Linnaeus,
1758) PARA LA OBTENCIÓN DE CARIOTIPOS**

ELLIE ANNE LÓPEZ BARRERA

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito para
optar el título de Bióloga Marina**

Director

Javier Hernández Fernández

M. Sc. Biología

**Asesor Investigador del Centro de Biología Molecular
Gimnasio Campestre**

UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE BIOLOGIA MARINA

BOGOTA D.C.

2005

Nota de Aceptación:

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Director

Bogotá, Octubre 31 de 2005

A mi familia, pilar esencial de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Doctor Jaime Bernal Villegas y a Javier Hernández Fernández por confiar en mi trabajo y abrirme las puertas del Centro de Estudios de Biología Molecular del Gimnasio Campestre.

A Maria Camila Rosso, por escucharme, aconsejarme y apoyarme siempre.

A Irene Valderrama, por estar allí cada vez que caía y necesitaba su mano para continuar.

A Rafael Barragán, porque siempre escuche de él las palabras que necesitaba en el momento indicado.

A las niñas del laboratorio que siempre estuvieron apoyándome hasta el final a pesar de todas las dificultades que siempre se me presentaban.

A Aminta Jauregui, por interceder por mí cada vez que necesitaba de muestras.

Al Acuario Mundo Marino, por facilitarme las muestras.

A Maria Fernanda Salazar y a Carolina Moterosa por ayudarme con sus tortugas.

A mis primos, mis tías y mis abuelitos que siempre me apoyaron y estuvieron junto a mí en las alegrías y en los problemas.

A mis amigas del colegio que nunca dejaron de confiar en mí y en mis tortugas.

A los que siempre estuvieron pendientes de mi trabajo y se interesaron por ayudarme.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	16
2	MARCO TEÓRICO	21
	2.1. Extracción de Sangre Periférica	21
	2.2. Cultivo de Linfocitos.....	24
	2.3. Caracterización del Conjunto Cromosómico	25
3	MATERIALES Y MÉTODOS	27
	3.1. Extracción de Sangre Periférica	27
	3.2. Cultivo de linfocitos de <i>Caretta caretta</i>	31
	3.3. Análisis Estadístico.....	37
	3.4. Caracterización del conjunto cromosómico.....	38
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
	4.1. Extracción de Sangre Periférica	42
	4.2. Cultivo de linfocitos de <i>Caretta caretta</i>	43
	4.2.1. Obtención de Plasma Enriquecido en linfocitos.....	44
	4.2.2. Volumen de Plasma Enriquecido en linfocitos	46
	4.2.3. Mitógeno (Fitohemaglutinina).....	49
	4.2.4. Suero Fetal Bovino	51
	4.2.5. Medio de Cultivo	54
	4.2.6. Temperatura de Incubación.....	57
	4.2.7. Tiempo de Incubación	59
	4.2.8. Inhibidor Mitótico (Colchicina)	62
	4.2.9. Solución Hipotónica	65
	4.2.10. Fijador (Carnoy).....	67
	4.3. Cariotipo de <i>Caretta caretta</i>	72
	4.3.1. Ideograma del conjunto cromosómico de <i>Caretta caretta</i>	73
	4.3.2. Cambios cromosómicos en <i>Caretta caretta</i>	76
5	CONCLUSIONES	80
6	BIBLIOGRAFÍA	84
7	ANEXOS	93

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación de Peso, volumen de sangre extraída de individuos de <i>Caretta caretta</i> que se encuentran en cautiverio en Santa Marta. Los individuos provienen de la playa Don Diego, Buritaca, Santa Marta, Magdalena.	30
Tabla 2. Condiciones de cultivo de linfocitos en <i>Podocnemis vogli</i> (Ortiz y Rodríguez, 2003), utilizadas como condiciones iniciales para determinar las condiciones óptimas del cultivo de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> en este estudio.	31
Tabla 3. Variables e indicadores de evaluación para determinar las condiciones óptimas del cultivo de linfocitos de <i>Caretta caretta</i>	34
Tabla 4. Clasificación de los cromosomas según la posición de centrómero (Levan <i>et al.</i> , 1964).....	40
Tabla 5. Clasificación de los cromosomas según la posición de centrómero y su tamaño (Bickham, 1975).....	41
Tabla 6. Tratamientos para la obtención de plasma de <i>Caretta caretta</i> enriquecido en linfocitos. n=20	44
Tabla 7. Concentraciones y tiempos de exposición al inhibidor mitótico en cultivo <i>in vitro</i> de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> . n laminas observadas=15.....	63
Tabla 8. Concentraciones y tiempos de exposición de la solución hipotónica en cultivo <i>in vitro</i> de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> . n laminas observadas=15	65
Tabla 9. Tratamientos utilizados para evaluar el fijador carnoy en cultivo <i>in vitro</i> de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> . n laminas observadas=15	68
Tabla 10. Variables óptimas para el cultivo de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> determinados en el presente estudio. n= número de laminas observadas.	70
Tabla 11. Protocolo Estandarizado para la obtención de metafases de <i>Caretta caretta</i> a partir de sangre periférica.....	71
Tabla 12. Parámetros de evaluación del complemento cromosómico para la elaboración del ideograma de <i>Caretta caretta</i> . n laminas observadas=20 pertenecientes a 12 individuos de <i>Caretta caretta</i>	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los senos cervicales para la obtención de sangre de una tortuga marina (Wibbels, 2000).	21
Figura 2. Células sanguíneas de <i>Chelonia mydas</i> . A. Eritrocito, B. Linfocito, C. Monocito, D. Heterofilo, E. Trombocito, F. Eosinofilo y G. Basofilo (Work et al., 1998).....	23
Figura 3. Ejemplares de <i>Caretta caretta</i> . Izquierda: Ejemplar con cinco pares de escudos costales. Derecha: Ejemplar con cuatro pares de escudos costales. (Tomada por Ellie Anne López Barrera).....	27
Figura 4. Muestreo de sangre del seno cervical dorsal de <i>Caretta caretta</i> . (Foto: Ellie Anne López Barrera, 2003).....	28
Figura 5. Individuos de <i>Caretta caretta</i> muestreados. A. Parte dorsal del individuo. B. Parte anterior del Individuo (Foto: Carolina Monterosa y Maria Fernanda Salazar, 2004).	28
Figura 6. Neonatos de <i>Caretta caretta</i> muestreados (Foto: Monterosa y Maria Salazar, 2004)	29
Figura 7. Pasos para el cultivo de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> a partir de sangre periférica.	32
Figura 8. Pasos para la obtención de células en metafase de <i>Caretta caretta</i> a partir de sangre periférica. (Foto: Mónica Jiménez, 2005).....	33
Figura 9. Tipo de células según su morfología. A, célula estimulada; B, célula no viable; C, célula viable (Ortiz y Rodríguez, 2003).	35
Figura 10. Grados de condensación de los cromosomas en metafase. A, condensación alta; B, condensación óptima; C, condensación baja (Ortiz y Rodríguez, 2003).	36
Figura 11. Grados de separación de los cromosomas. I, completamente separados; II, cruzados; III, cerrados dentro de la metafase; IV, incompletos (Ortiz y Rodríguez, 2003).	37
Figura 12. Extracción de sangre de <i>Caretta caretta</i> con <i>Vacutainer</i> (Foto: Ellie Anne López Barrera, 2003).	42
Figura 13. Linfocitos de <i>Caretta caretta</i>	46

Figura 14. Indicadores para evaluar el volumen de Plasma Enriquecido para inoculación en medios de cultivo de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> . IV: Índice de viabilidad, IE: Índice de Estimulación, IM: Índice Mitótico. n=20.....	48
Figura 15. Indicadores para evaluar la concentración de fitohemaglutinina para el cultivo de <i>Caretta caretta</i> . IV: Índice de viabilidad, IE: Índice de Estimulación, IM: Índice Mitótico. n=20.....	50
Figura 16. Indicadores para evaluar la concentración de SFB para el cultivo <i>in vitro</i> de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> . IV: Índice de viabilidad, IE: Índice de Estimulación, IM: Índice Mitótico. n= 20.....	53
Figura 17. Indicadores para evaluar el medio de cultivo <i>in vitro</i> para linfocitos de <i>Caretta caretta</i> . IV: Índice de viabilidad, IE: Índice de Estimulación, IM: Índice Mitótico. n= 15	56
Figura 18. Indicadores para evaluar la temperatura de incubación para el cultivo de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> . IV: Índice de viabilidad, IE: Índice de Estimulación, IM: Índice Mitótico. n=15.....	58
Figura 19. Indicadores para evaluar el tiempo de incubación para el cultivo <i>in vitro</i> de linfocitos de <i>Caretta caretta</i> . IV: Índice de viabilidad, IE: Índice de Estimulación, IM: Índice Mitótico. n=15.....	60
Figura 20. A. Metafase de <i>Caretta caretta</i> en óptima condensación B. Metafase en baja condensación.....	64
Figura 21. Metafase de <i>Caretta caretta</i> en alta condensación.	64
Figura 22. Metafase de <i>Caretta caretta</i> donde se observan cromosomas separados.	66
Figura 23. Metafase de <i>Caretta caretta</i> cerrada.	67
Figura 24. A. Metafase con halo de citoplasma y residuos celulares, B. Metafase sin halo de citoplasma con residuos celulares.....	69
Figura 25. Cariograma de <i>Caretta caretta</i> en coloración Giemsa.	72
Figura 26. Cariograma de <i>Caretta caretta</i> mostrando la posición centromérica.	73
Figura 27. Ideograma del complemento cromosómico de <i>Caretta caretta</i>	74

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO DE LINFOCITOS DE LA TORTUGA CABEZONA *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) PARA LA OBTENCIÓN DE CARIOTIPOS

RESUMEN

En los últimos años se ha registrado una disminución importante en el número de individuos de la tortuga marina *Caretta caretta* anidantes en el Caribe colombiano lo que hace que se encuentre en vías de extinción. Por esto, es necesario implementar planes de manejo y conservación. Con este estudio se pretende determinar los requerimientos del cultivo de linfocitos de *Caretta caretta* para la obtención de cariotipos que permitan la identificación citogenética, el estudio inmunológico y toxicológico de individuos sin necesidad de sacrificarlos. Se obtuvieron muestras de sangre periférica en 47 individuos de *Caretta caretta* de Santa Marta, Colombia. Se realizaron 352 ensayos evaluando diferentes formas de extracción de linfocitos, concentraciones de fitohemaglutinina, temperaturas de incubación, estimulación de las células con diferentes concentraciones de suero fetal bovino, tiempos de exposición y concentraciones del inhibidor mitótico, tiempos de turgencia celular en solución hipotónica, concentración de la solución fijadora y diferentes tiempos y concentraciones de lavado. Obteniéndose las condiciones óptimas para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*: i) obtención de plasma enriquecido mediante 3 centrifugaciones por 1 min. y utilización del pellet de células blancas resuspendidas en 1 ml de Suero Fetal Bovino, ii) medio TC 199; iii) volumen de inoculación de plasma enriquecido en linfocitos de 0.5 ml; iv) concentración de fitohemaglutinina de 100.000µg/ml al 8%; v) suero fetal bovino al 20%; vi) temperatura de incubación de 32°C; vii) tiempo de incubación de 95.5 horas; viii) colchicina 50 µg/ml al 4% durante 45 min.; ix) 40 min. en solución hipotónica 0.05 M; x) prefijación carnoy 6:1 durante 5 min. xi) tres fijaciones con carnoy 3:1 durante 10, 30 y 15 min. respectivamente. Con estas condiciones se obtuvieron cromosomas separados con una óptima condensación, adecuados para la observación y análisis cariológico.

El cariotipo obtenido para *Caretta caretta* fue: 56 cromosomas donde 32 son macrocromosomas y 24 microcromosomas. El ideograma mostró que *Caretta caretta* tiene cuatro grupos de cromosomas: el grupo A compuesto por doce (12) pares de cromosomas de mayor tamaño. El Grupo B compuesto por cuatro (4) pares de cromosomas medianos y pequeños y el Grupo C conformado por 12 pares de microcromosomas.. No se observaron cromosomas sexuales. Estos resultados están en desacuerdo con el cariotipo descrito por Kamesaki (1989), debido posiblemente a que las muestras analizadas en el primer estudio fueron colectadas en el Océano Pacífico (Japón) y el presente estudio es el primero realizado en el Océano Atlántico que cuenta con la descripción completa de la morfología cromosómica. Es posible, que una de las estrategias adaptativas de esta especie sea el intercambio genético con otras especies de la familia que produce de esta forma individuos híbridos viables. En este aspecto se ha descrito la hibridación de tortugas *Caretta caretta* con *Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas* y *Lepidochelys kempii* (Conceição *et al.*, 1990; Bowen *et al.*, 1996; Karl *et al.*, 1995; Bowen *et al.*, 1993; Avise *et al.*, 1992). Lo que sugiere la posibilidad que los individuos caracterizados en este estudio sean híbridos viables de *Caretta caretta*, por lo tanto se hace necesario realizar estudios a nivel molecular.

1 INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas han sido catalogadas a nivel mundial como especies en peligro de extinción y en la actualidad son protegidas y conservadas directa o indirectamente mediante diversos convenios internacionales como el CITES, así como por Leyes y Decretos Nacionales (INVEMAR, 2002). Uno de ellos es el Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales en Colombia, el cual tiene como visión “Lograr en el año 2022 la conservación y manejo sostenible de las especies de tortugas en Colombia”. Los objetivos específicos del programa están referidos a la implementación de planes de manejo, restauración de poblaciones de tortugas marinas, apoyo y fortalecimiento de esfuerzos e iniciativas para su conservación, promover el soporte científico, adoptar mecanismos para cumplir tratados internacionales, generar directrices para regular y coordinar actividades de protección e investigación, abordar acciones en forma coordinada y sistemática y la generación y adopción de mecanismos normativos que respalden las acciones emprendidas para la conservación de todas las especies de tortugas marinas en Colombia (PNCTMCC, 2003).

A pesar de contar con estos instrumentos jurídicos, pocas son las acciones concretas que se han adelantado en Colombia para la protección y conservación de las tortugas marinas. Las acciones de investigación, manejo y educación ambiental han sido iniciativas de investigadores independientes, fundaciones sin ánimo de lucro, universidades o algunas corporaciones autónomas, que no responden a un plan de trabajo único de alcance nacional;

como consecuencia el estado del conocimiento sobre las tortugas marinas y sus hábitats es precario y desordenado (INVEMAR, 2002).

Teniendo como referencia el informe final del INVEMAR, realizado en el 2002 sobre la distribución y estado actual de conservación de las tortugas marinas en el Caribe colombiano, *Caretta caretta* (Anexo 1) es la especie más vulnerable, ya que ocupa la menor extensión de playa para anidar (360 Km lineales de playa), presenta el menor índice de anidación y por lo tanto, una baja ocurrencia de avistamientos en la costa Caribe colombiana. Esta disminución en el número de tortugas anidantes es producida por factores como la depredación de los huevos por parte de animales o por el hombre, el consumo de tortugas adultas o juveniles por humanos y la acumulación de desechos orgánicos (madera, pastos, algas o restos coralinos) e inorgánicos (plásticos, vidrios, latas, cauchos) en las proximidades de las playas elegidas por esta especie para depositar sus huevos.

Este marco referencial hace evidente la necesidad de implementar programas de conservación; por lo tanto, es de suma importancia identificar las poblaciones de tortugas marinas que se encuentren presentes dentro de un área determinada, ya que la falta de conocimiento sobre la estructura de las poblaciones de tortugas marinas incrementa las dificultades para el desarrollo y planes efectivos para su manejo. Para esto se han empleado técnicas como marcas pasivas, telemetría satelital y estudios genéticos (Bowen *et al.*, 2000). Estos últimos permiten reconocer poblaciones de una forma rápida y segura, sin embargo, las técnicas moleculares que son empleadas tienen costos muy elevados, lo cual impide su aplicación de una forma generalizada. Se hace necesario entonces implementar técnicas genéticas de menor costo como la citogenética que sirven como una herramienta para generar información de línea base, y con ella, identificar poblaciones en áreas determinadas.

Los estudios de citogenética de reptiles fueron desarrollados principalmente entre 1914 y 1983 mediante el sacrificio de individuos, permitiendo que en la actualidad se conozcan 918 cariotipos de la clase Reptilia, de los cuales 140 pertenecen al orden Testudines (Peccinini- Seale, 1981). En 1976 se publicó un compendio de la taxonomía y filogenia de las tortugas cryptodiras donde se reconocen por medio del análisis citogenético 10 superfamilias (Emydidae, Testudinidae, Platysternidae, Staurotypidae, Chelydrydae, Kinosternidae, Dermatemyidae, Cheloniidae, Trionchidae y Carettochelydae); dentro de ese estudio reconocen a Cheloniidae como la rama de más temprana derivación de la línea Cryptodira (Bickham y Baker, 1976).

Dentro de la Familia Cheloniidae se encuentra la especie *Caretta caretta*, pero actualmente no se cuenta con ningún estudio de citogenética realizado específicamente en el Caribe colombiano; sin embargo, investigaciones encaminadas a caracterizar el cariotipo de la especie fueron realizadas en Japón principalmente. En 1989, Naoki Kamezaki expone que *Caretta caretta* presenta 56 cromosomas diploides: 32 macrocromosomas (12 metacéntricos, 2 submetacéntricos, 6 subtelocéntricos, 12 acrocéntricos) y 24 microcromosomas. Sus resultados coinciden con los obtenidos por Bickham (1981) y Bickham y Carr (1983) aunque estos no realizan una descripción detallada del cariotipo de la especie, ni presentan la procedencia de los individuos muestreados. Nakamura en 1949 registró que las tortugas de esta especie (provenientes de Shirahama, península de Kii, Japón) presentaban 57 cromosomas en hembras y 58 en machos. Estos resultados contrastan con los obtenidos por este mismo autor en 1937 donde afirma que las hembras de la especie *Caretta caretta* de la misma localidad presentaban 51 cromosomas y los machos 52 cromosomas.

Se han realizado estudios citogenéticos para caracterizar el cariotipo de algunas de las diferentes especies de tortugas marinas. Medrano *et al.*, (1987),

demonstraron que *Dermochelys coriacea* exhibe 56 cromosomas diploides (14 metacéntricos y submetacéntricos; 10 telocéntricos y subtelocéntricos, y 32 microcromosomas); esta especie ha sido considerada como una tortuga primitiva dentro de las Cryptodira. Sin embargo, el cariotipo que presenta es muy similar a los descritos para *Chelonia mydas* (Bickham *et al.*, 1980) (56=2N; 14 metacéntricos y submetacéntricos, 10 telocéntricos y subtelocéntricos y 32 microcromosomas), para *Eretmochelys imbricata* (Kamezaki, 1990) (56=2N; 10 metacéntricos, 2 submetacéntricos, 2 subtelocéntricos, 8 acrocéntricos y 34 microcromosomas) y para *Caretta caretta* (Kamezaki, 1989) (56= 2N; 12 metacéntricos, 2 submetacéntricos, 6 subtelocéntricos, 12 acrocéntricos y 24 microcromosomas); poniendo en discusión la clasificación filogenética de *Dermochelys coriacea*.

Las técnicas empleadas en los estudios citogenéticos de tortugas marinas expuestos por Bickham y Carr (1983), Medrano *et al.*, (1987), Kamezaki, (1989; 1990) y en general los realizados en quelonios por Killebrew, (1975), Bickham, (1975), Bickham y Baker, (1976) y Bickham *et al.*, (1980) requieren la muerte de los neonatos o de los individuos a analizar, ya que la metodología implementada requiere la inoculación *in vivo* de los animales con soluciones de colchicina. Después del sacrificio se pueden obtener células de bazo, pulmón, riñón (Medrano *et al.*, 1983) o de espina medular (Kamezaki, 1989). Estas células son cultivadas y estimuladas para obtener metafases, que posteriormente permiten obtener el cariotipo.

Se hace evidente la necesidad de generar técnicas de citogenética no invasivas para reptiles, ya que muchos de estos se encuentran catalogados dentro de listas de protección internacional por extinción o en estado de vulnerabilidad. En los últimos años se ha utilizado el cultivo de linfocitos extraídos de la sangre periférica para efectuar estudios de citogenética en diferentes animales; a pesar de esto, hasta el momento no se ha realizado

ninguna investigación que utilice una técnica no invasiva en tortugas marinas. Sin embargo, existen estudios en tortugas de agua dulce que utilizan un protocolo similar y permiten la estandarización de los requerimientos de cultivos *in vitro* y la obtención de suficientes metafases para realizar una caracterización completa del cariotipo de tortugas de agua dulce (Maecha, 1998; Ulsh *et al.*, 2001; Ortiz y Rodríguez, 2003).

El presente estudio tiene como objetivo general determinar los requerimientos del cultivo de linfocitos de *Caretta caretta* para la obtención de metafases a partir de muestras de sangre periférica. Los objetivos específicos de la investigación son generar información sobre las características cariológicas de la especie en Santa Marta, Colombia; generar un protocolo que permita la obtención de metafases a partir de sangre periférica e implementar una técnica no invasiva que permita la identificación citogenética de tortugas marinas. Este estudio da las bases para futuras investigaciones en citogenética de tortugas cabezonas en otras áreas de anidación o hábitat de la especie, en las cuales se logre identificar poblaciones mediante la comparación de bandas cromosómicas características de cada región analizada.

Este trabajo se presenta como un requisito para optar el título de Bióloga Marina en la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular del Gimnasio Campestre y contó con el apoyo logístico del Acuario Mundo Marino de Santa Marta y el Laboratorio de Citogenética de PREGEN.

2 MARCO TEÓRICO

2.1. Extracción de Sangre Periférica

El muestreo de crías y tortugas adultas en el mar o en cautiverio puede realizarse obteniendo sangre o tejido, teniendo el cuidado necesario para evitar la infección de los individuos o la contaminación cruzada de las muestras (Dutton, 1996). En animales vivos la superficie donde la sangre o tejido será extraído debe adecuadamente para evitar la contaminación (Dutton, 1996). También deben limpiarse los instrumentos completamente entre muestreos sucesivos (o desecharlos), y los tubos de la muestra deben ser nuevos, limpios y estar etiquetados (Bowen *et al.*, 2000). Normalmente la sangre se extrae de los senos cervicales dorsales del cuello y a cualquier lado de la columna vertebral (Owens y Ruiz, 1980) (Figura 1).

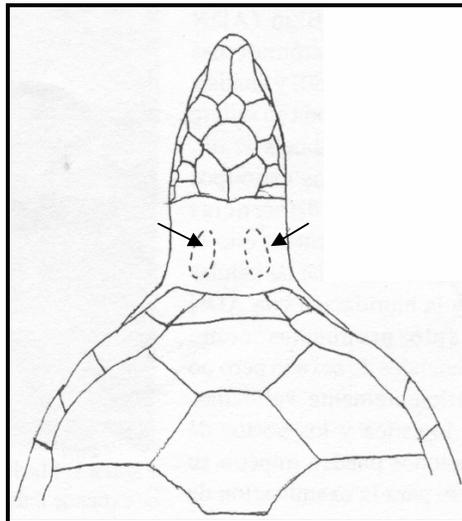


Figura 1. Ubicación de los senos cervicales para la obtención de sangre de una tortuga marina (Wibbels, 2000).

En las tortugas adultas este seno puede encontrarse entre uno y tres centímetros debajo de la superficie de la piel. El muestreo se hace más fácil si la cabeza del animal se coloca en un ángulo de 45° aproximadamente para aumentar el flujo de la sangre hacia esa región (Wibbels, 2000). Es importante tener en cuenta que la extracción de sangre es una técnica simple, pero es necesario tener cuidado ya que los errores pueden generar daños en los vasos sanguíneos o al tejido nervioso protegido por la columna vertebral, sobre todo en las crías (Dutton, 1996).

Es importante reconocer la morfología de las células sanguíneas para identificarlas adecuadamente ya que en reptiles todas las líneas celulares sanguíneas son nucleadas (Dessaure, 1970). Estudios realizados en *Chelonia mydas* (Work et al., 1998) permiten reconocer a los eritrocitos como células ovales con citoplasma naranja y núcleo púrpura que miden de 17 a 20 μm se encuentran entre un 17 y 35% de células en la sangre (Figura 2A). Los linfocitos miden de 6 a 14 μm de diámetro, son células bien definidas que poseen un núcleo púrpura que ocupa casi la totalidad de la célula y que posee abundante cromatina, (Figura 2B), se pueden encontrar un promedio de 10 células*10³ / μl ; los monocitos poseen una forma ameboide y miden de 11 a 26 μm de diámetro, su núcleo es redondo u oval y ocupa 0.66% del citoplasma (Figura 2C) se pueden encontrar un promedio de 0.8 células*10³ / μl ; los heterofilos miden de 10 a 18 μm de diámetro y se caracterizan por ser muy densos y tener un núcleo redondo u oval, púrpura y excéntrico (Figura 2D), se pueden encontrar un promedio de 1.4 células*10³ / μl , los trombocitos miden de 9 a 12 μm , el núcleo es oval y lobulado de un color púrpura denso y homogéneo (Figura 2E), los eosinofilos miden de 12 a 22 μm de diámetro y tienen un núcleo amorfo y excéntrico (Figura 2F) se pueden encontrar un promedio de 1.7 células*10³ / μl y los basofilos son las células más raras de encontrar en la sangre de tortugas marinas y es un citoplasma bien definido y posee numerosos gránulos basofilos que oscurecen el núcleo de color púrpura (Figura 2G) (Work et al., 1998)

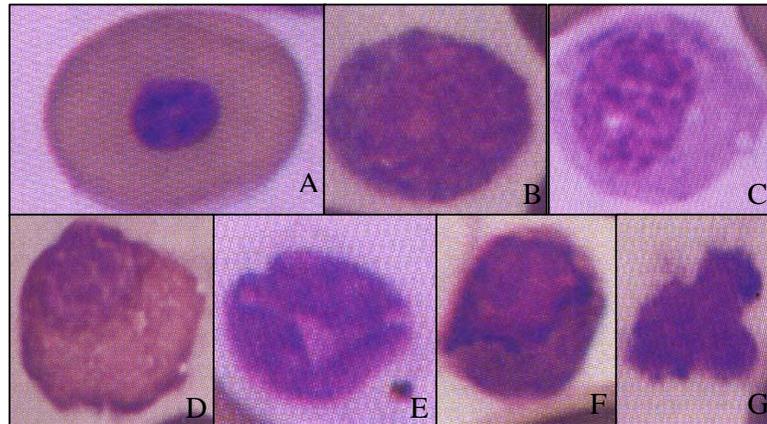


Figura 2. Células sanguíneas de *Chelonia mydas*. A. Eritrocito, B. Linfocito, C. Monocito, D. Heterofilo, E. Trombocito, F. Eosinofilo y G. Basofilo (Work et al., 1998).

Como en muchos vertebrados, en la sangre de los reptiles el número de células blancas depende de diferentes factores como son la variación geográfica que implican las condiciones ambientales; el sexo, observándose mayor cantidad de células en hembras que en machos; la edad, reflejándose en un mayor número de basofilos y linfocitos en individuos jóvenes que en adultos y las enfermedades que permiten un aumento en la proporción de eosinofilos (Duguy, 1985). En cuanto a la composición química de la sangre de los reptiles, se observa que entre un 3 y 7% de la sangre esta conformada por una compleja mezcla de proteínas y su cantidad depende del estado de desarrollo, edad y estado fisiológico del individuo; dentro de estas proteínas se encuentran las que son especializadas en funciones de transporte, una de estas proteínas es análoga a la albúmina humana y es esencial para el transporte de aniones tóxicos; otras proteínas envuelven respuestas inmunológicas y las de coagulación de la sangre y se han observado cambios marcados en la cantidad de lípidos que dependen de ciclos metabólicos estacionales (Dessaure, 1970). Todas estas variables inciden en el crecimiento y proliferación de cultivo de linfocitos y por ende, en la consecución de metafases.

2.2. Cultivo de Linfocitos

Las condiciones del cultivo de linfocitos varían de acuerdo a la especie con la cual se trabaja por las características únicas que se requieren para el crecimiento particular de las células (Bueno, 2003). En este tipo de cultivos las células pueden crecer libres en el medio, sin necesidad de adherirse a las paredes del recipiente donde se encuentran. Los medios más utilizados para el cultivo de linfocitos son: RPMI 1640, Medio Esencial Mínimo y Medio TC 199, también es necesario adicionar Suero Fetal Bovino (SFB) para suministrar factores de crecimiento que induzcan el desarrollo celular (Silva *et al.*, 1991).

Ya que los linfocitos normalmente no se multiplican *in vivo* es necesario estimularlos mediante la adición de un agente mitótico, para esto se han utilizado agentes mitógenos en cultivos de linfocitos de testudines como la flavina, el LPS proveniente de líneas celulares de *Escherichia coli* (Lipopolisacarido Sigma No. L2630 serotipo 0111:B4) (Ortiz y Rodríguez, 2003) y la concavalina A (Ulsh *et al.*, 2001), pero ninguno de estos a tenido índices mitóticos comparables con los obtenidos con la fitohemaglutinina, extraída de *Phaseolus vulgaris* (frijol) (Salamanca, 1993). Este agente mitógeno actúa por medio de las glucoproteínas vegetales (lecitinas) que se acoplan a las proteínas de membrana de los linfocitos y estimulan su transformación en linfoblastos en las primeras 24 horas del cultivo. Luego, los propios linfocitos segregan interleuquina 2, que estimula su división, para obtener metafases (Solari, 2000). Aunque la fitohemaglutinina es la más utilizada no todas las especies responden adecuadamente a su estímulo, debido a que las concentraciones óptimas difieren en cada una (Ortiz y Rodríguez, 2003).

Para garantizar un alto número de células en metafase se debe aplicar una sustancia que impida la formación de las fibras del huso mitótico como la colchicina (Silva *et al.*, 1991), la cual es un alcaloide extraído del colquico, que

produce la contracción de los cromosomas durante la metafase e impide que se de la anafase, y por lo tanto, la formación de células hijas mediante la polimerización de las proteínas que forman los microtubulos del huso (Blanco, 1982).

Luego, para poder obtener buenas preparaciones citológicas, se hace necesario producir un aumento en el volumen celular por medio de un tratamiento con solución hipotónica antes de realizar la fijación; todo esto se realiza con el fin de asegurar una buena dispersión de los cromosomas dentro de la célula (Silva *et al.*, 1991). El último paso es la fijación, lo cual generalmente se realiza con Carnoy el cual permite extraer los residuos celulares, manteniendo la membrana nuclear intacta hasta el proceso de extensión de las láminas, lo que permite una identificación fácil de los cromosomas en metafase (Ortiz y Rodríguez, 2003).

El objetivo de esta técnica de preparación es obtener el conjunto de todos los cromosomas de la célula dispersos y sin superposiciones para que puedan ser contados y analizados, conservando su morfología y dispuestos en un solo plano, de modo que con una microfotografía se obtenga el cariotipo (Solari, 2000).

2.3. Caracterización del Conjunto Cromosómico

El cariotipo se define como el conjunto de características que permiten reconocer la dotación cromosómica de una célula, es propio de cada especie y se identifica por el número de cromosomas, tamaño y forma de estos, ya que son la máxima expresión del plegamiento del ADN (Darnell *et al.*, 1988). Para su reconocimiento son importantes ciertas características, como la posición del centrómero y la presencia de satélites, entre otras. El complemento normal

haploide o diploide de una célula al ser organizado de forma sistemática constituye el cariotipo característico de una especie (Ortiz y Rodríguez, 2003). Este presenta el número cromosómico y el número fundamental. La clasificación de los cromosomas de acuerdo a su tamaño y morfología permite determinar la fórmula cariológica y la representación gráfica del cariotipo, esto es llamado ideograma (Solari, 2000).

El estudio de la morfología de los cromosomas se realiza cuando estos adquieren su configuración de máxima condensación, es decir, cuando se encuentran situados en la llamada placa metafásica de la mitosis (Santander, 1976). Una clasificación cromosómica a nivel morfológico se obtiene analizando la posición del centrómero, dependiendo si origina brazos de longitudes variables (iguales, ligeramente desiguales o muy desiguales) y al relacionar la longitud total del cromosoma, (la longitud del brazo corto y la longitud del brazo largo) (Santander, 1976).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Extracción de Sangre Periférica

Se colectaron muestras de sangre periférica en 47 ejemplares de *Caretta caretta* pertenecientes al Acuario Mundo Marino de Santa Marta; dos de ellos eran individuos juveniles de dos años y medio de edad y las 45 restantes eran tortugas mantenidas en cautiverio desde las primeras horas de eclosión hasta que cumplieron un año y pertenecían a la misma nidada. Algunos de estos individuos presentan cuatro pares de escudos costales (Figura 3), en vez de cinco, sin embargo estos individuos no pudieron ser muestreados.



Figura 3. Ejemplares de *Caretta caretta*. Izquierda: Ejemplar con cinco pares de escudos costales. Derecha: Ejemplar con cuatro pares de escudos costales. (Tomada por Ellie Anne López Barrera)

Las muestras fueron extraídas de ejemplares que se encontraban en perfecto estado de salud, registraban los mayores pesos y no presentaban deformaciones morfológicas, con el fin de evitar errores que pudieran alterar los resultados. A cada individuo se le registro la playa de origen, edad y sexo cuando fue posible.

Después de seleccionar los individuos a muestrear se siguió el protocolo propuesto por Dutton (1996) (Figura 4) modificando el calibre de las agujas (40* 0.8 mm) y utilizando *Vacutainers* de 1, 5 y 10 ml con heparina sódica para preservar la muestra. Estos individuos presentaban la morfología taxonómica característica de la especie *Caretta caretta* (Figura 5).



Figura 4. Muestreo de sangre del seno cervical dorsal de *Caretta caretta*. (Foto: Ellie Anne López Barrera, 2003)



Figura 5. Individuos de *Caretta caretta* muestreados. A. Parte dorsal del individuo. B. Parte anterior del Individuo (Foto: Carolina Monterosa y Maria Fernanda Salazar, 2004).

Aunque no se encuentra descrita en la literatura la tasa hematopoyética de las tortugas marinas; la comunicación con otros investigadores que realizaron estudios en diferentes áreas como inmunología y toxicología (Harms *et al.*, 2000; Jacobson *et al.*, 1989,1992; Hochscheid *et al.*, 2002), recomiendan la

recolección de muestras cada semana en los mismos individuos sin causar daños en la salud. Thorson (1968) y Mader (1996) reportan que el volumen de muestra de sangre promedio para tortugas marinas corresponde al 6-7% de la masa corporal del individuo; por lo tanto, se sugiere que por cada 1000 gramos se extraiga un (1) mililitro de sangre. En este estudio se tuvo en cuenta la relación entre masa corporal y volumen de sangre recolectada al realizar los muestreos.

Debido a que algunos individuos eran neonatos (Figura 6) se realizó la extracción de sangre en los individuos que presentaban un mayor peso. En la Tabla 1 se registran los pesos de los individuos muestreados, al iniciar el estudio los neonatos presentaron pesos entre 800 y 1150 gr. y en el último muestreo pesaron entre 1200-1917 gr. Los individuos juveniles pesaron entre 12500-15250 gr. También se realizaron pruebas hematológicas en el Laboratorio Clínico de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional a 20 individuos para determinar el número promedio de células en *Caretta caretta* (Anexo 2). Esto se realizó con el fin de cuantificar especialmente el número de linfocitos.



Figura 6. Neonatos de *Caretta caretta* muestreados (Foto: Monterosa y Maria Salazar, 2004)

Tabla 1. Relación de Peso, volumen de sangre extraída de individuos de *Caretta caretta* que se encuentran en cautiverio en Santa Marta. Los individuos provienen de la playa Don Diego, Buritaca, Santa Marta, Magdalena.

INDIVIDUO	PESO(gr.)	VOLUMEN DE SANGRE EXTRAIDO (ml)	EDAD (meses)		
Simona	15250	10	18	Juvenil	
Jania	12500	10			
B	1917	1	11	Neonatos	
CN	1660	0.9			
CZ	1700	1.5			
C6	1566	1			
Chb	1530	1.3			
CNR	1650	1.5			
Ch	1700	1			
C	1464	1			
Chc	1098	1			
Ch2	1820	1			
VNC	1660	1			
MBG	1530	1			
6M	1400	1			
6	1200	1			
6 BM	1685	1			
BGR	1423	1.2			10
RB	1420	1.2			
VMG	1500	1.2			
GRB	1250	1.2			
VCG	1400	1.2			
RGV	1550	1.2			
CGV	1340	1			
CR	1450	1.2			
NC	1300	1			
GRV	1200	1			
VB	1350	1.2			
ZC	1420	1.2			
RVG	1300	1.2			
MGV	1110	1			
BRG	1150	1	9		
BCV	1200	1			
VRB	1160	1			
RGB	1150	0.9			
RC	850	0.8			
VCR	850	0.8			
Vz	970	0.9			
V6	830	0.7			
RBV	821	0.8			
RBG	1163	1			
RBB	906	0.9			
BC	1058	1			
VM	1111	1			
VCB	1097	1			
BG	1061	1			
GV	1020	1			

Posteriormente se trasladaron las muestras al Laboratorio de Biología Molecular del Gimnasio Campestre en Bogotá, para establecer el cultivo de linfocitos y obtener el cariotipo de las tortugas. Durante el desarrollo del estudio fue necesario realizar muestreos de sangre varias veces en tiempos distintos para la realización de los diferentes experimentos.

3.2. Cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*

En este estudio se estableció un protocolo para tortugas marinas tomando como condiciones iniciales las descritas en la investigación realizada por Ortiz y Rodríguez (2003) (Tabla 2), en la cual se logró estandarizar un protocolo para el análisis citogenético de la tortuga dulceacuícola *Podocnemis vogli* y fue evaluado en otras especies de tortugas con resultados exitosos; modificándole una variable en cada uno de los experimentos con el fin de analizarlas independientemente.

Tabla 2. Condiciones de cultivo de linfocitos en *Podocnemis vogli* (Ortiz y Rodríguez, 2003), utilizadas como condiciones iniciales para determinar las condiciones óptimas del cultivo de linfocitos de *Caretta caretta* en este estudio.

Obtención del Plasma	Centrifugar a 400 RPM , 2 min., decantar 40 min.
Volumen de Inoculación de plasma enriquecido en linfocitos	1 ml
Mitógeno	Fitohematoglutinina (PHA-P) (0.4 ml; 5600 µg/ml)
Suero Fetal Bovino (SFB)	1 ml; 20%
Medio de Cultivo	TC 199 (4 ml)
Temperatura de incubación	30° C
Tiempo de incubación	94 horas
Inhibidor mitótico	Colchicina (0.2 ml; 0.64 µg/ml)
Tiempo de Inhibidor mitótico	40 min.
Solución Hipotónica	KCl (0.05 M)
Tiempo de la Solución Hipotónica	45 min.
Fijador	Carnoy frío (6:1 y 3 :1)

El establecimiento de metafases de *Caretta caretta* se obtuvo ensayando cada una de las variables independientemente. En la medida que se obtenían resultados positivos con una variable se procedió a ensayar con otra, siempre teniendo en cuenta el protocolo estandarizado por Ortiz y Rodríguez (2003). En cada muestreo se realizaba el procedimiento descrito en la Figura 7 para el cultivo de linfocitos. Para la obtención de células en metafase se siguió el procedimiento descrito en la Figura 8.

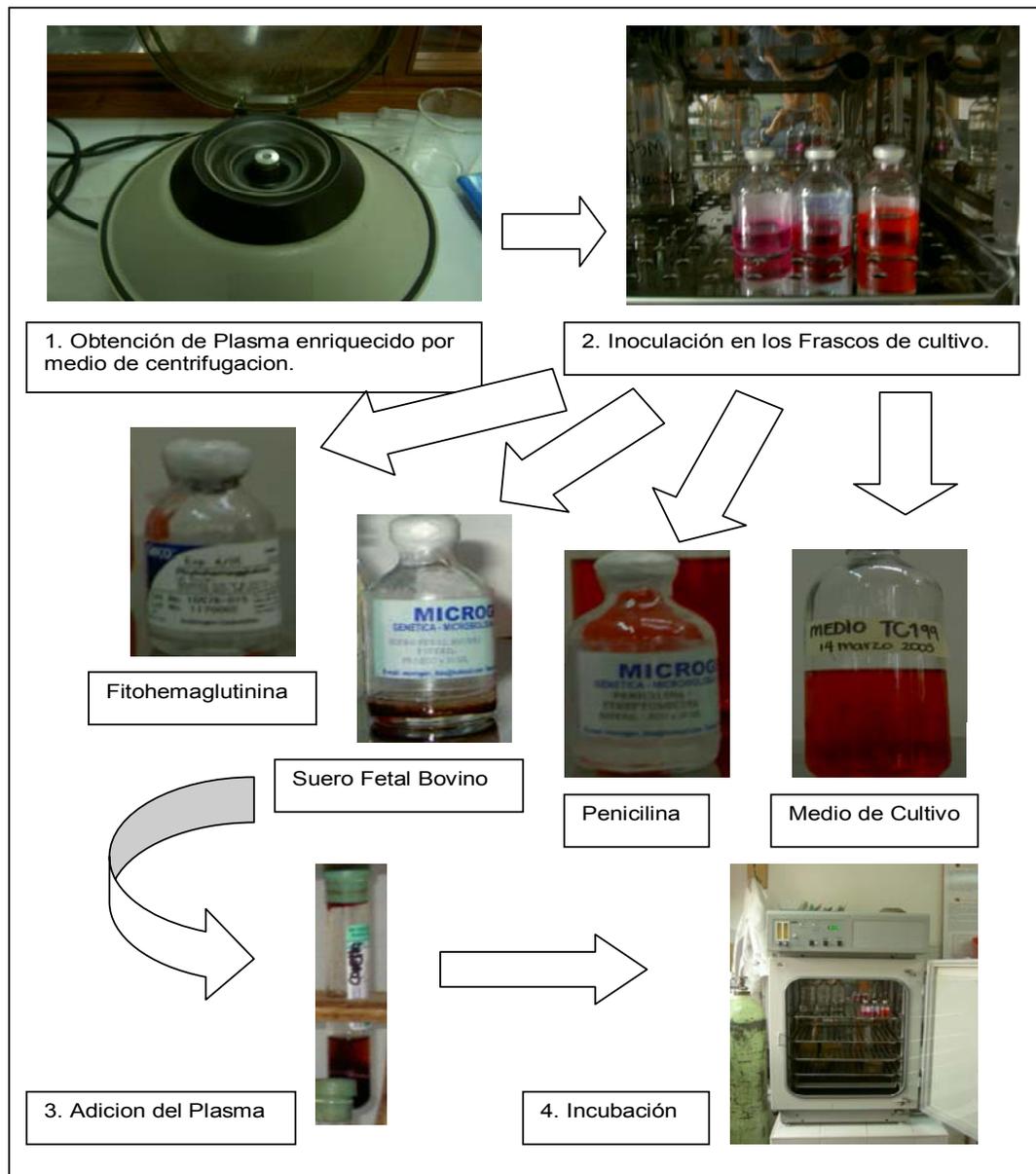


Figura 7. Pasos para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta* a partir de sangre periférica. (Foto: Mónica Jiménez, 2005)

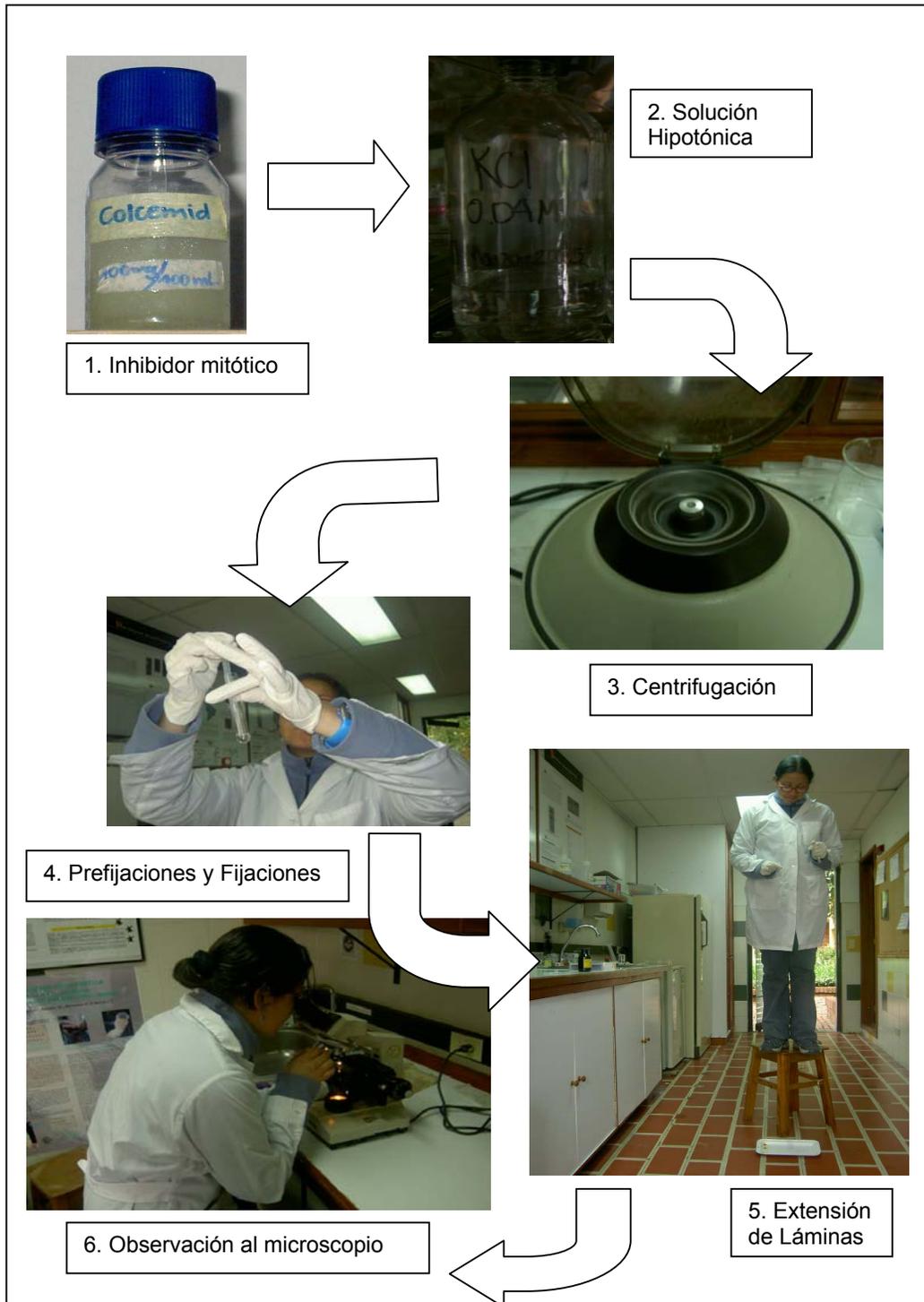


Figura 8. Pasos para la obtención de células en metafase de *Caretta caretta* a partir de sangre periférica. (Foto: Mónica Jiménez, 2005)

Para determinar las mejores condiciones de cultivo de linfocitos de *Caretta caretta* se evaluaron las variables que se presentan en la Tabla 3, teniendo en cuenta los indicadores para cada variable.

Tabla 3. Variables e indicadores de evaluación para determinar las condiciones óptimas del cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*

Variable	Tratamiento	Indicador
Obtención del Plasma	Centrifugación a 400 rpm 2 min., decantar 40 min.	Índice Mitótico
	Centrifugación 2 min. a 500 rpm	
	Centrifugación 1 min. a 500 rpm	
	2 Centrifugaciones 1 min. a 500 rpm	
	3 Centrifugaciones 1 min. a 500 rpm	
Volumen de inoculación de plasma enriquecido en linfocitos	0.5 - 1 ml	Índice Mitótico Índice de Estimulación Índice de Viabilidad
Mitógeno	PHA-P (10-5600-8400-100000 µg/ml)	
SFB	10%-15%-20%-30%	
Medio de cultivo	TC 199- RPMI 1640	
Temperatura de incubación	24- 30-31-32-37°C	
Tiempo de incubación	94-94.5-95-95.5-96-96.5-97 horas	
Inhibidor mitótico	Colchicina (25-30-50 µg/ml)	Grado de condensación de los cromosomas
Tiempo de Inhibidor mitótico	30-40-45-50 min.	
Solución Hipotónica	KCl (0.07-0.06-0.05-0.04-0.03-0.02M)	Grado de separación de los cromosomas
Tiempo de Sol. Hipotónica	30-40-45-50 min.	
Fijador	Carnoy- 3:1- 6:1	Morfología de las metafases
Tiempo de Fijador	5-15-30 min.	

Cada uno de los tratamientos realizados se evaluó microscópicamente observándose entre 15 y 20 láminas. Se observaron barridos verticales en láminas portaobjetos en un microscopio de luz Olympus C20 en 10, 40 y 100X. Posteriormente, se calculo el promedio de células en la totalidad de la lámina

de acuerdo a los campos examinados y sobre el promedio observado en 40 X se procedió a calcular el índice de estimulación, cómo:

$$IE = (\text{No. células estimuladas} / \text{No. total de linfocitos}) * 100$$

el índice de viabilidad cómo:

$$IV = (\text{No. células viables} / \text{No. total de linfocitos}) * 100$$

el índice mitótico cómo:

$$IM = (\text{No. de metafases obtenidas} / \text{No. total de linfocitos}) * 100$$

Con el fin de aplicar los índices utilizados por Ortiz y Rodríguez (2003) como indicadores, se clasificaron las células según el criterio de Maecha (1998) teniendo en cuenta que las células que presentaban una morfología poco definida o irregular y con una coloración oscura se denominan células no viables. Las células que presentaban una coloración uniforme y una membrana celular continua e hidratada son células viables; y las que presentan un mayor tamaño y coloración más intensamente, se denominaron células estimuladas (Figura 9).

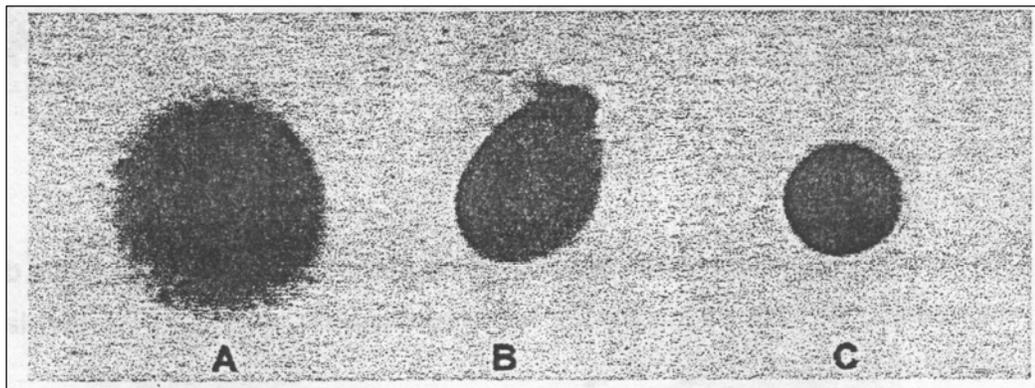


Figura 9. Tipo de células según su morfología. A, célula estimulada; B, célula no viable; C, célula viable (Ortiz y Rodríguez, 2003).

Para evaluar el grado de condensación de los cromosomas se tuvo en cuenta el criterio empleado por Ortiz y Rodríguez (2003), en el cual, se clasifican los cromosomas como altamente condensados, si se encuentran demasiado amontonados; de condensación óptima, si se observaban bien definidos y un poco engrosados; y de baja condensación, cuando se observaban en un estado casi de hilos y no se logran distinguir claramente (Figura 10).

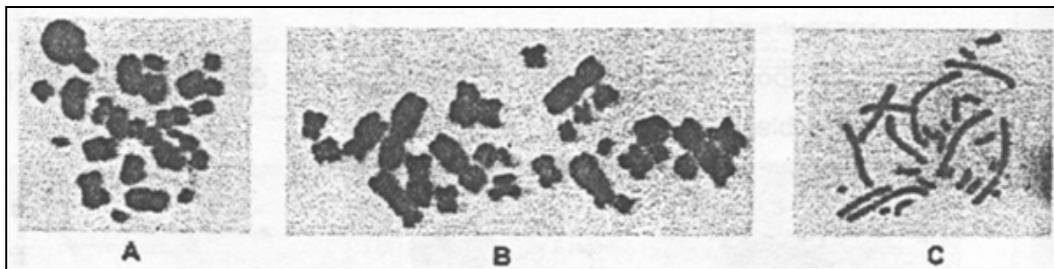


Figura 10. Grados de condensación de los cromosomas en metafase. A, condensación alta; B, condensación óptima; C, condensación baja (Ortiz y Rodríguez, 2003).

Para evaluar el grado de separación de los cromosomas se tuvo en cuenta las categorías propuestas por Ortiz y Rodríguez (2003), donde estos se clasifican en completamente separados cuando sus formas son bien definidas y se puede distinguir cada cromosoma; cruzados, si se encuentran superpuestos unos con otros; cerrados dentro de la metafase, si no se logran distinguir claramente y se encuentran agrupados en masas; incompletos y con aumento de residuos celulares, cuando se observan casi disueltos y en partes separadas; y en lisis celular, cuando se encuentran totalmente fraccionados (Figura 11).

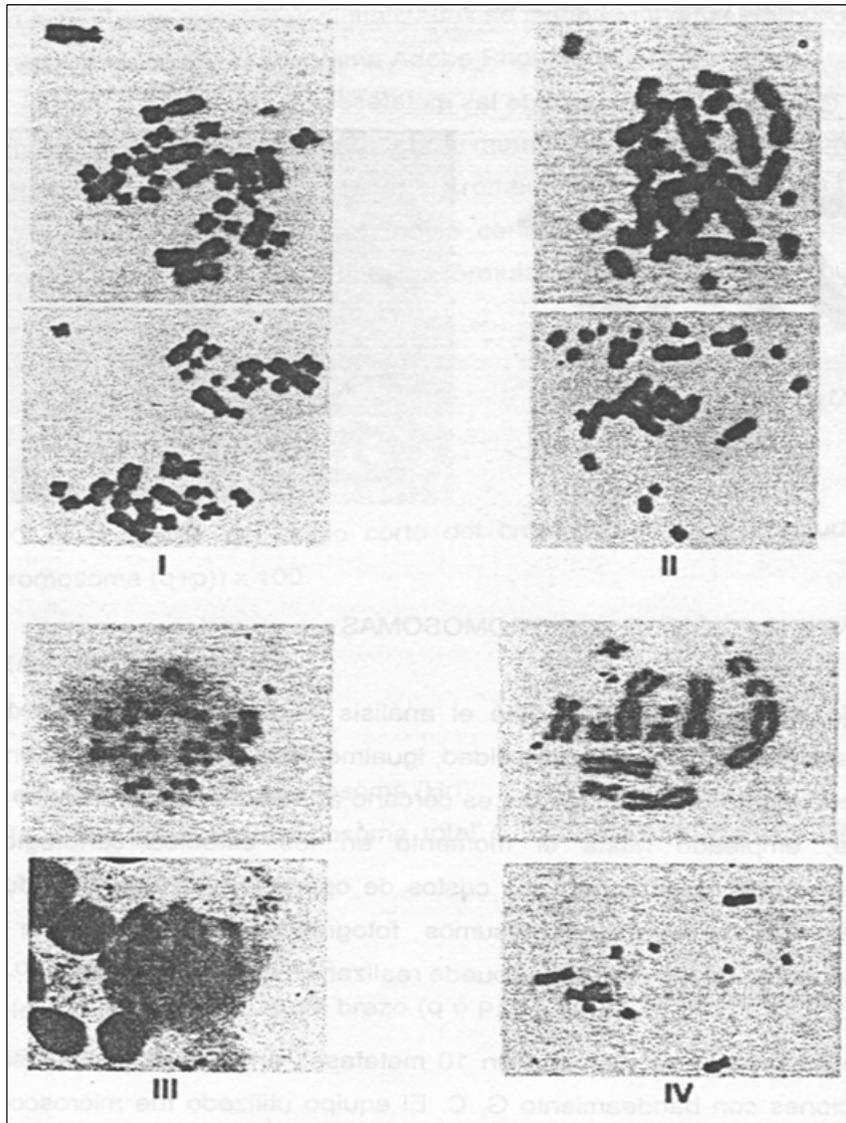


Figura 11. Grados de separación de los cromosomas. I, completamente separados; II, cruzados; III, cerrados dentro de la metafase; IV, incompletos (Ortiz y Rodríguez, 2003).

3.3. Análisis Estadístico

Mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 se realizaron análisis estadísticos con el fin de observar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cada índice evaluado para cada variable. Inicialmente se realizó la conversión angular o arcosen en los datos debido a que estos eran porcentajes, posteriormente se aplicó el test de normalidad de Shapiro-Wilks.

Cuando los datos lo requerían se aplicó la prueba paramétrica ANOVA para comparar más de dos muestras y la prueba t cuando eran dos muestras; cuando era necesario aplicar pruebas no paramétricas se utilizó el test de Mann-Whitney para comparara dos muestras y el test de Kruskall-Wallis al analizar más de dos muestras.

Posteriormente se utilizó el programa Statistix 7.0 en los datos a los cuales se les aplicó la prueba de ANOVA para observar entre cuales tratamientos se presentaban las diferencias mediante la prueba de Tukey y en los datos en los cuales se utilizó el test de Kruskall-Wallis se realizó una comparación de rangos de medianas con el fin de observar cuales tratamientos tenían diferencias estadísticamente significativas. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un alfa de 0.05.

3.4. Caracterización del conjunto cromosómico

Después de determinar las condiciones óptimas para el cultivo de linfocitos para *Caretta caretta*; se procedió a identificar los cromosomas por medio de digitalización de las láminas donde se encuentran las mejores metafases para realizar posteriormente la caracterización del conjunto cromosómico.

Este proceso se realizó en el Laboratorio de Citogenética de PREGEN, empleando un microscopio Zeiss Axiolab HBO 50/AC conectado a una cámara digital Canon GS Power Shot. Se midieron 20 metafases pertenecientes a 12 individuos diferentes a través del programa de edición de imágenes Adobe Photoshop 8.0., el cual permite una medición exacta de la imagen obtenida (cm, píxeles, pulgadas). Se realizaron los cálculos promedio mediante las

fórmulas propuestas por Ortiz y Rodríguez (2003) para encontrar la medida de longitud de los brazos p y q mediante la fórmula:

$$q = (q_1 + q_2) / 2 \quad \text{y} \quad p = (p_1 + p_2) / 2$$

donde p equivale al brazo corto del cromosoma y q el brazo largo del cromosoma. También se calculó el índice centromérico mediante la fórmula:

$$IC = (\text{Longitud } p / \text{Longitud total del cromosoma})$$

y el índice de proporcionalidad de los brazos mediante la fórmula:

$$i.p.b = \text{Longitud } p / \text{Longitud } q$$

Se tuvo en cuenta la relación de los brazos mediante la fórmula:

$$R = (\text{Longitud } q / \text{Longitud } p)$$

la longitud relativa del cromosoma mediante la fórmula:

$$Hrl = (\text{Longitud total del cromosoma} / \Sigma \text{ longitud de los cromosomas del conjunto haploide}) * 100$$

y la longitud relativa del brazo mediante la fórmula:

$$HRL \text{ } q \text{ ó } p = (\text{Longitud del brazo} / \Sigma \text{ Longitud de los cromosomas del conjunto haploide}) * 100$$

Según el valor de los índices mencionados anteriormente los cromosomas se catalogaron teniendo en cuenta la clasificación propuesta por Levan *et al.*, (1964), basada en la posición del centrómero (Tabla 4); este autor define como cromosomas metacéntricos a los que poseen el centrómero en la mitad de la longitud total del cromosoma y al acodarse lo hace en forma de “V” con los brazos iguales, el índice de proporcionalidad de los brazos es igual a 1 o más y el índice centromérico es igual a la mitad.

Tabla 4. Clasificación de los cromosomas según la posición de centrómero (Levan *et al.*, 1964).

Posición del centrómero	Nombre	Símbolo	Relación de los brazos	Índice centromérico
Región media	Metacéntrico	M	1.0-1.7	50-37.5
Región submedia	Submetacéntrico	Sm	1.71-3.0	37.6-25
Región subterminal	Subtelocéntrico	St	3.01-7.0	25.1-12.5
Región terminal	Acrocéntrico	A	7.01-39	12.6-2.5
Punto terminal	Telocéntrico	T	∞	0

Los cromosomas submetacéntricos presentan el centrómero ligeramente desviado de la mitad de la longitud total del cromosoma, pero siempre más cerca de la mitad que de un extremo, lo cual origina brazos desiguales que al acodarse adoptan la forma de “L”. El índice de proporcionalidad de los brazos puede estar comprendido entre 1 y 0.33, pero siempre menos que la unidad y el índice centromérico esta comprendido entre 0.5 y 0.25 (Levan *et al.*, 1964).

Los cromosomas acrocéntricos son aquellos que presentan el centrómero hacia un extremo de la longitud total del cromosoma, lo cual origina dos brazos desiguales; al acodarse adoptan la forma de “J”; el índice de proporcionalidad de los brazos siempre es menor de 0.33; y el índice centromérico es siempre menor de 0.25. Los cromosomas telocéntricos son aquellos que presentan el centrómero en un extremo (Levan, 1964). También se tomo en cuenta la propuesta por Bickham (1975) el cual realizó estudios citogenéticos con quelonios y propuso una clasificación de los cromosomas según la posición del centrómero y su tamaño (Tabla 5)

Tabla 5. Clasificación de los cromosomas según la posición de centrómero y su tamaño (Bickham, 1975).

Grupo A	Grupo B	Grupo C
Macrocromosomas metacéntricos y submetacéntricos	Macrocromosomas acrocéntricos y subtelocéntricos	Microcromosomas cuya posición centromérica no se distingue

Se realizó la descripción cariológica incluyendo el número diploide ($2n$), el número total de brazos (No. fundamental) y el número de macro y microcromosomas. Se estableció el cariograma de *Caretta caretta* mediante el ordenamiento sistemático en orden decreciente teniendo en cuenta la longitud de los cromosomas. Posteriormente se realizó el ideograma para *Caretta caretta* con base en los promedios de longitud de los brazos obtenidos de cada par cromosómico.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Extracción de Sangre Periférica

Se realizaron 18 muestreos entre los 47 individuos analizados obteniéndose un volumen final de sangre de 364 ml que fueron utilizados para determinar las condiciones óptimas para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*. Al realizar el muestreo se observó que la extracción de sangre periférica con *Vacutainers* presenta mayor dificultad porque era necesario mover la aguja dentro del cuello del individuo para encontrar el seno cervical (Figura 12), esto causó estrés en los individuos muestreados y para evitar algún daño en la médula espinal las siguientes extracciones de individuos se realizaron con jeringas de 5 ml y agujas de 40*0.8 mm.



Figura 12. Extracción de sangre de *Caretta caretta* con *Vacutainer* (Foto: Ellie Anne López Barrera, 2003).

Dutton (1996) describe que para neonatos se deben utilizar jeringas de 1 ml y agujas de 29*12.7 mm, sin embargo, cuando se realizó el muestreo de los individuos de 9 meses de edad este procedimiento no fue apropiado, ya que la aguja no penetraba en el seno cervical impidiendo de esta forma el flujo de sangre desde este hacia la jeringa; por lo tanto fue necesario utilizar el mismo procedimiento para extraer sangre en neonatos y en juveniles.

En cuanto a las obtención de las muestras de sangre periférica de las tortugas *Caretta caretta*, en este estudio se observó que el 1% de las extracciones de sangre realizadas se infectaron posiblemente por mal manejo en la asepsia durante la extracción de la sangre. En el 2% de los muestreos se obtuvieron células con morfología degenerativa, es decir, con membranas celulares poco definidas y citoplasmas traslucidos, esto se puede explicar por un efecto toxico que causa en las células el anticoagulante (heparina sódica) (Bolten *et al.*, 1992), ya que los *Vacutainers* tenían capacidad para almacenar 10 ml de sangre y solo fueron colectados con 5 ml o menos de sangre, este fenómeno también se observó cuando las muestras estuvieron más de 24 horas en los *Vacutainers* sin ser procesadas, lo cual ocasiono que las células empezaran a deteriorarse. Como se puede ver la casi totalidad de las muestras (95-97%) obtenidas cumplieron con los requisitos de asepsia y calidad de las células para realizar los cultivos de linfocitos.

4.2. Cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*

Se realizaron un total de 352 experimentos con el fin de evaluar las doce (12) variables necesarias para obtener metafases de *Caretta caretta*. En cada montaje se evaluó una sola variable, con el fin de analizarlas independientemente. Inicialmente se realizaron 327 ensayos para determinar las variables del cultivo de linfocitos de *Caretta caretta* (medio de cultivo, volumen de inoculación, concentración de fitohemaglutinina y de Suero Fetal Bovino) estos ensayos se realizaron a diferentes temperaturas (Tabla 3). Posteriormente se realizaron cinco (5) montajes que permitieron determinar el tiempo de incubación de los linfocitos y el pico de proliferación celular. Luego se realizaron 25 experimentos que permitieron determinar el grado óptimo de condensación y separación de los cromosomas (concentración y tiempo de exposición del mitógeno y la solución hipotónica). Consecutivamente se

evaluaron tres (3) tratamientos con Carnoy donde se variaban las concentraciones y los tiempos de exposición.

4.2.1. Obtención de Plasma Enriquecido en linfocitos

Debido a que la sangre de *Caretta caretta* posee eritrocitos nucleados es necesaria la separación del plasma y los glóbulos blancos y/o linfocitos de la sangre total para realizar los cultivos. Se realizaron cinco (5) experimentos para la obtención de plasma enriquecido (Tabla 6). Las condiciones iniciales para la separación del plasma fue la sugerida por Ortiz y Rodríguez (2003); en la cual, se realiza una centrifugación de la sangre total a 400 rpm durante 2 minutos y luego se decantan 40 minutos. Sin embargo, con las muestras de *Caretta caretta*, al realizar este procedimiento (Tratamiento 1, Tabla 6); en el paso de la centrifugación, no se obtiene un plasma turbio con linfocitos, pero si se observaba la formación de una zona de células blancas sobre la capa de células rojas, por lo que el plasma obtenido no poseía células (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos para la obtención de plasma de *Caretta caretta* enriquecido en linfocitos. n=20

No.	Tratamiento	rpm	Tiempo (min)	Índice Mitótico Promedio
1	1 Centrifugación Decantación	500	2 40	0
2	Centrifugación	500	2	0
3	1 Centrifugación	500	1	0
4	2 Centrifugaciones	500	1	12.3
5	3 Centrifugaciones	500	1	23.6

Debido a que con la centrifugación los linfocitos de *Caretta caretta* se precipitan con los eritrocitos, y según los resultados obtenidos por Ortiz y Rodríguez (2003) el 50% de la concentración de linfocitos en el sobrenadante esta dado por la centrifugación. No se realizaron más pruebas con decantación y se evaluaron tratamientos con centrifugación en menor tiempo (Tabla 6).

En el tratamiento 3, al realizar una sola centrifugación se obtenían cultivos con una baja cantidad de linfocitos y se observaba después de 24 horas de iniciado el cultivo, una capa gelatinosa en el fondo del frasco de cultivo que atrapaba los linfocitos, y por lo tanto, no se podía iniciar la división celular (Tabla 6). La formación de esta capa posiblemente se deba a la polimerización de las proteínas del plasma ya que el porcentaje de proteínas descrito en el plasma total de *Caretta caretta* es de 4.7% (Dessauer, 1970), uno de los más altos en comparación con las demás especies del Orden Testudines. Aunque también es posible que al ser individuos en cautiverio, al igual que otros reptiles, almacenen el exceso de nutrientes en la sangre y no en tejido graso, observándose un valor alto de proteínas en la sangre como se evidenció en el análisis hematológico (Anexo 2). En los siguientes experimentos se realizó una dilución del plasma enriquecido en linfocitos retirando un mililitro de plasma y resuspendiendo las células en 1 ml de Suero Fetal Bovino, para evitar la formación de esta capa gelatinosa que posiblemente atrapaba los linfocitos y no permitía su división.

El experimento 5 produjo el mayor promedio de índice mitótico (23.6); debido a la alta concentración de linfocitos en el plasma, realizando 3 centrifugaciones a 500 rpm durante 1 minuto, tomando el sobrenadante y la primera capa de células rojas en las dos primeras centrifugaciones y en la última solo la capa de células blancas resuspendidas en 1 ml de Suero Fetal Bovino (Tabla 6). Por lo tanto se escogió este para realizar la separación de plasma enriquecido en linfocitos de *Caretta caretta* durante el desarrollo del presente estudio.

4.2.2. Volumen de Plasma Enriquecido en linfocitos

En el Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia se realizaron conteos de células sanguíneas en 20 individuos muestreados durante el desarrollo de la investigación (Anexo 2), describiéndose un número promedio de células blancas para la especie *Caretta caretta* de 2937 Cel/ μ l. Al realizar cultivos con el plasma enriquecido en linfocitos y resuspendido en 1 ml de Suero Fetal Bovino se observó un índice mitótico promedio de 8.2, las laminas que se obtenían resultaban saturadas de linfocitos (Figura 13 A) y presentaban un índice de estimulación promedio de 18.7 y un índice de viabilidad promedio de 58.1 (Figura 13).

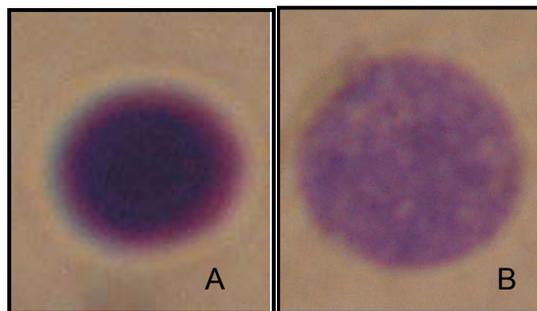


Figura 13. Linfocitos de *Caretta caretta*.
A. Viable. B. Estimulado.

Esta alta cantidad de células observadas posiblemente impida la división debido a las bajas concentraciones de los factores proteicos extracelulares que permiten que el ciclo celular se desarrolle. La competencia entre células por nutrientes y espacio también puede influir al limitar la densidad de la población celular, impidiéndose de esta forma la proliferación óptima de linfocitos, por lo cual estos solo alcanzan a ser células viables (Figura 13 B), ya que no se iniciaba el ciclo celular y las metafases obtenidas eran escasas (Bruce *et al.*, 1996).

Al observar que la densidad celular era muy alta se decidió sembrar solo la mitad de plasma enriquecido es decir, que el plasma se resuspendía en 1 ml de Suero Fetal Bovino, pero se sembraban 0.5 ml de esta mezcla en el frasco de cultivo. De esta forma, se obtuvo un índice mitótico y de estimulación promedio más alto (29.5 y 32.4 respectivamente) (Figura 14); debido a que la competencia por los factores proteicos extracelulares se disminuye considerablemente.

El índice de viabilidad con siembras de 1 ml fue casi del doble de lo obtenido cuando se sembró 0.5 ml; debido posiblemente al alto número de células blancas que posee la especie (Anexo 2) por lo cual, al estar en un volumen de medio tan reducido (4 ml) las células compiten por los nutrientes y espacio generando una producción de desechos metabólicos alto, lo cual puede resultar en la baja cantidad de metafases encontradas en los tratamientos donde se sembró 1 ml de suero en comparación con los experimentos donde se sembró 0.5 ml, ya que los linfocitos no lograban completar el ciclo celular.

Se realizaron las pruebas estadísticas para el Índice mitótico, el índice de estimulación y el índice de viabilidad mediante el test de Mann-Whitney observando diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos de volumen de siembra evaluados, con un valor p menor a 0.05. Debido a que se obtuvieron mejores resultados con un volumen de inoculación de 0.5 ml se tomo este para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*.

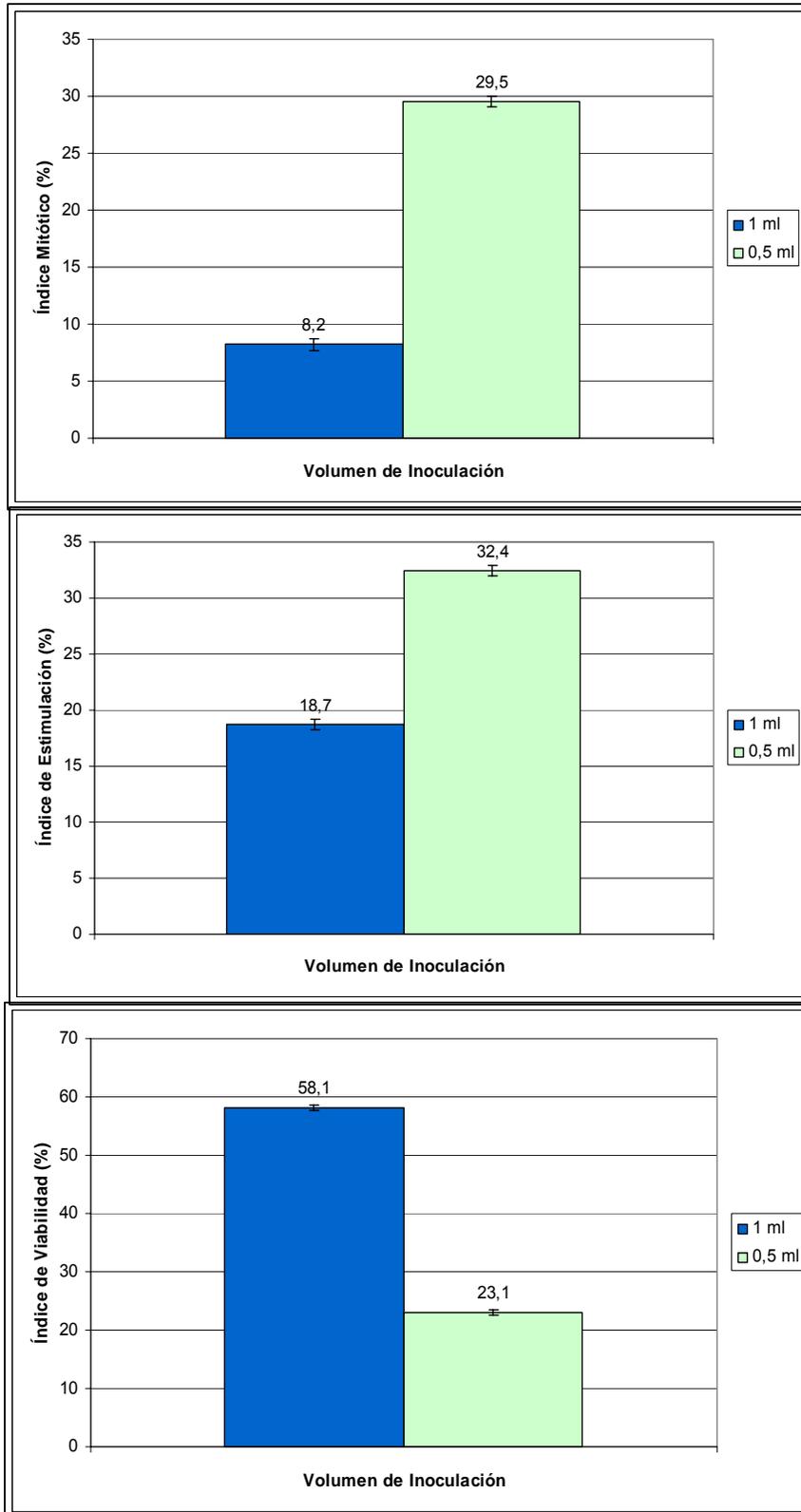


Figura 14. Indicadores para evaluar el volumen de Plasma Enriquecido para inoculación en medios de cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*. IM: Índice Mitótico, IE: Índice de Estimulación, IV: Índice de viabilidad. n laminas observadas=20

4.2.3. Mitógeno (Fitohemaglutinina)

El cultivo de linfocitos en humanos se realiza con fitohemaglutinina en una concentración de 10 µg/ml; aunque esta sustancia es la más utilizada para este tipo de cultivos, no todas las especies responden adecuadamente al estímulo debido a que las concentraciones óptimas difieren en cada una (Ortiz y Rodríguez, 2003). En la Figura 15 se observa que las dos primeras concentraciones de fitohemaglutinina utilizadas tuvieron un alto número de células estimuladas pero no se encontraron células en metafase; mientras que en las concentraciones de 8.400 y 100.000 µg/ml se obtuvieron los mayores índices mitóticos y un porcentaje alto de células viables y estimuladas.

Este comportamiento celular posiblemente se deba a que en concentraciones menores (10 y 5.600 µg/ml) las células viables son estimuladas adecuadamente, pero no alcanza a provocar una respuesta en un número suficiente de células para poder obtener metafases; en cambio con el mismo tiempo de incubación en concentraciones mayores de fitohemaglutinina (8.4000 y 100.000 µg/ml) es posible estimular células más rápidamente para poder observar metafases.

Debido a que la fitohematoglutinina actúa afectando la actividad funcional de las células T al unirse a ciertos residuos de azúcares presentes en las glucoproteínas de superficie en las células, estimula la respuesta proliferativa de los linfocitos T (Hernández *et al.*, 1999) transformándolos en linfoblastos en las primeras 24 horas del cultivo para que luego ellos mismos segregen interleuquina 2 la cual estimula su división (Solari, 2000), se hace evidente que a mayores concentraciones de este agente mitógeno la células reciben una estimulación más eficiente en el cultivo *in vitro* de linfocitos de *Caretta caretta*.

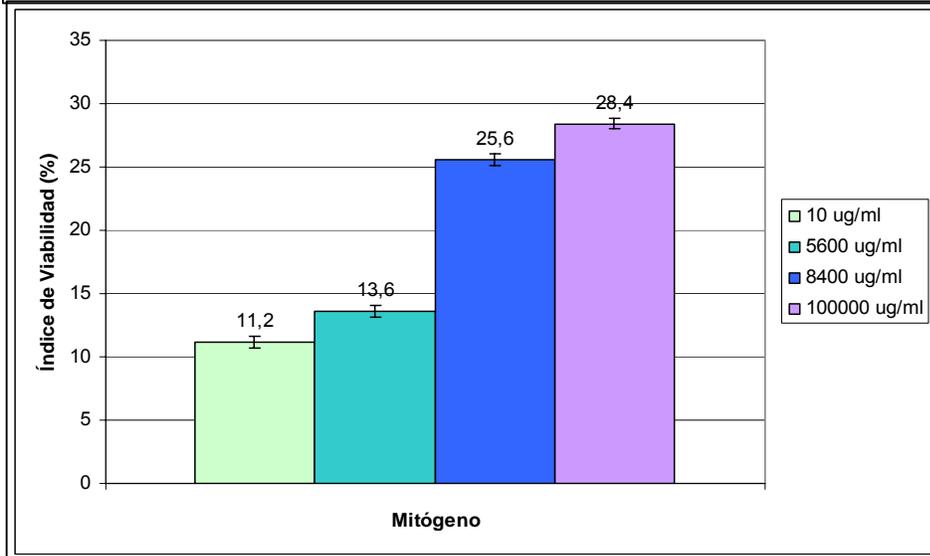
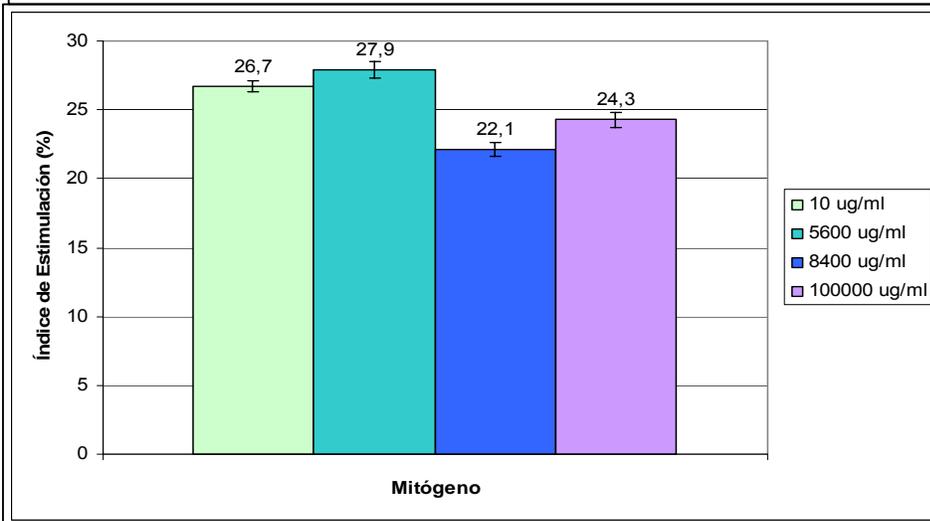
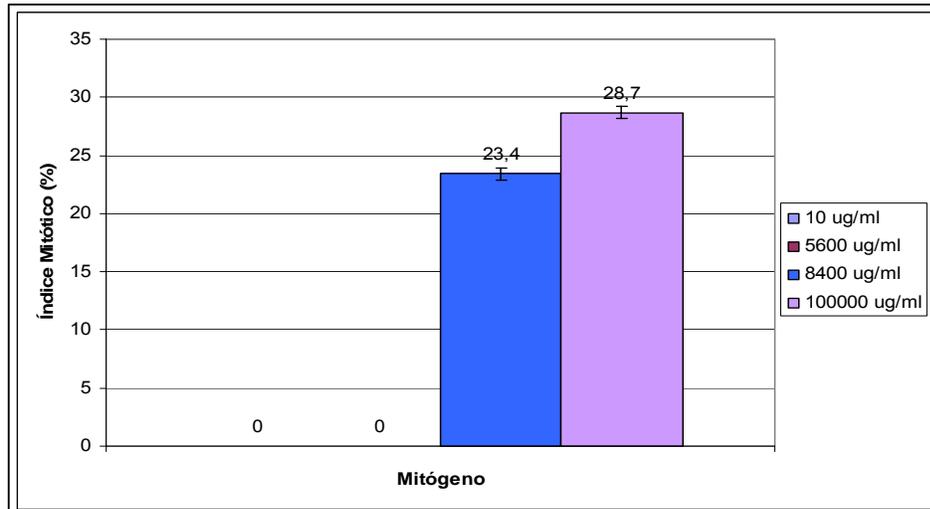


Figura 15. Indicadores para evaluar la concentración de fitohemaglutinina para el cultivo de *Caretta caretta*. IM: Índice Mitótico, IE: Índice de Estimulación, IV: Índice de viabilidad. n laminas observadas =20

Se realizaron las pruebas estadísticas para el Índice mitótico mediante una prueba t y se observaron diferencias estadísticamente significativas con un valor p de 0.0. El índice de estimulación y el índice de viabilidad se analizaron mediante pruebas de ANOVA evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados con un valor p de 0.00 para los dos índices. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para observar entre cuales tratamientos se presentaban las diferencias y con un valor Q de 3.745 se observaron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos con un alfa de 0.05.

Después de realizar los análisis se determinó que la concentración de 100.000 µg/ml adicionando 0.4 ml para una concentración final de 8% estimula eficiente y adecuadamente los linfocitos de *Caretta caretta* y fue determinada esta concentración durante toda la investigación.

4.2.4. Suero Fetal Bovino

El suero fetal bovino (SFB) es una mezcla compleja de muchas moléculas que esencialmente permiten el acoplamiento y distribución de las células en el medio, mediante la estimulación, nutrición y protección (Yildirim, 1998). Este es fundamental en el cultivo de células en medios artificiales; ya que el crecimiento celular requiere de un suplemento con hormonas y otros factores de crecimiento que están involucrados en transporte de nutrientes, mantenimiento de balance de energía celular, control de síntesis de macromoléculas y factores que estimulan la formación del producto deseado (Macleod, 1988).

Se evaluaron diferentes concentraciones finales de SFB, observándose que en las menores concentraciones no se presentan células en metafase y que el índice de viabilidad era mayor que el de estimulación para todos los tratamientos (Figura 16); esto podría deberse a que las concentraciones menores de 20% no son adecuadas para promover el crecimiento celular de linfocitos de *Caretta caretta*, debido a que la especie presenta un número relativamente alto de células blancas (2937 Cel/ μ l de las cuales 57% son linfocitos) en comparación con otras tortugas (*Rhinoclemmys diademata*, 1750 Cel/ μ l con 54% de linfocitos y *Podocnemis vogli*, 3996 Cel/ μ l con 32% de linfocitos)(Maecha, 1998; Ortiz y Rodríguez, 2003).

Aunque Díaz *et al.*, (2003), argumentan un posible efecto tóxico del SFB al usarse en altas concentraciones, en este estudio se observa que en concentraciones relativamente altas (30%), el efecto de este no es nocivo para las células, debido al alto índice mitótico y de estimulación que se observó (Figura 16). Sin embargo, el cultivo con concentraciones de 30 % de SFB presentó el menor valor de estimulación (Figura 16); debido posiblemente a un efecto de toxicidad leve.

Esto indica que en los casos en que se emplea una alta concentración celular se puede prescindir de altas concentraciones de suero, permitiendo así mayores crecimientos al evitar la posible influencia de factores de inhibición en el SFB que producen un posible efecto tóxico visible en el elevado número de células no viables.

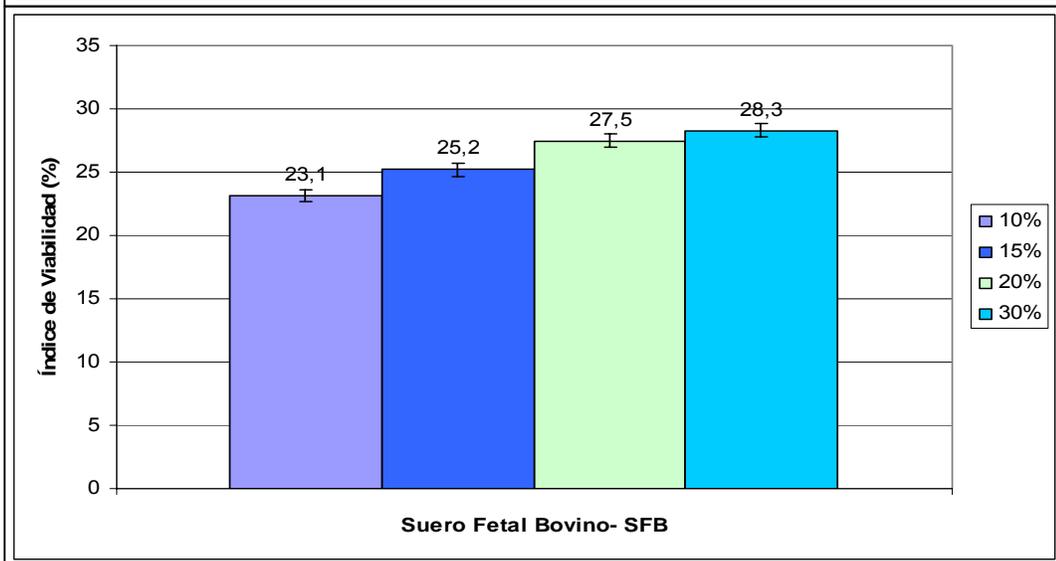
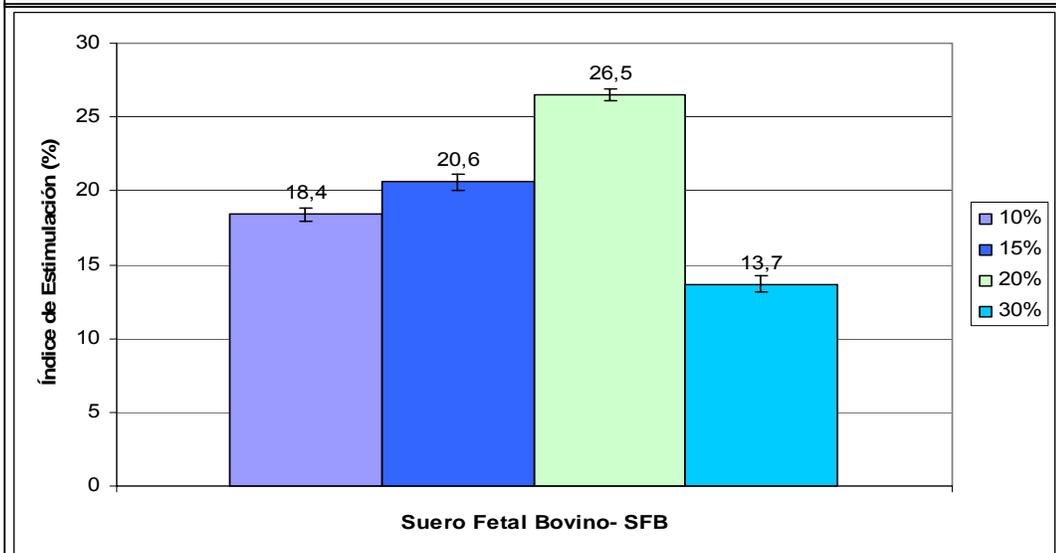
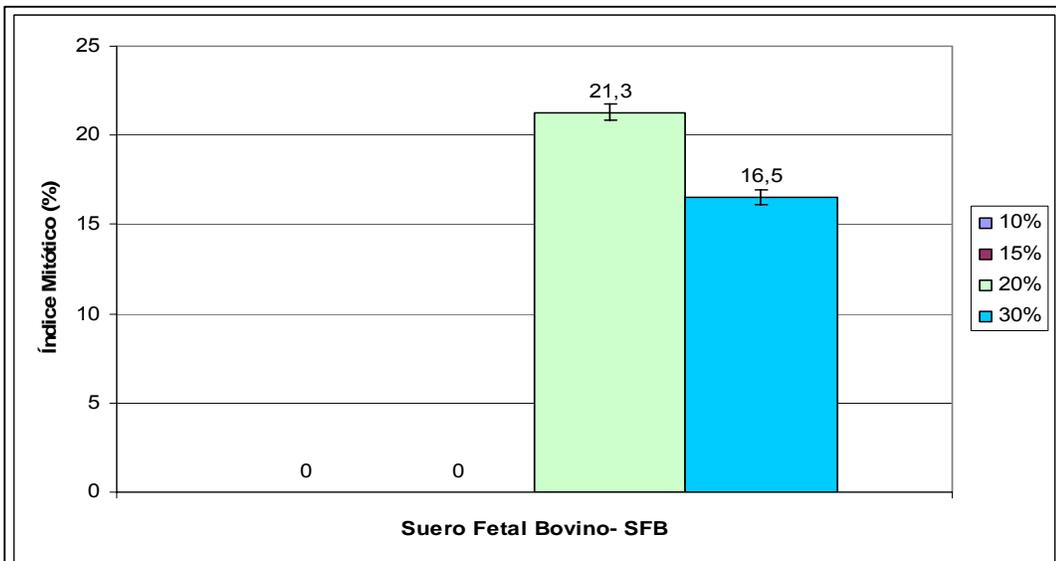


Figura 16. Indicadores para evaluar la concentración de SFB para el cultivo *in vitro* de linfocitos de *Caretta caretta*. IM: Índice Mitótico, IE: Índice de Estimulación, IV: Índice de viabilidad. n laminas observadas = 20.

Se realizaron las pruebas estadísticas para el Índice mitótico mediante una prueba t y se observaron diferencias estadísticamente significativas con un valor p de 0.0. El índice de estimulación se analizó mediante una prueba ANOVA evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados con un valor p de 0.00, posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para observar entre cuáles tratamientos se presentaban las diferencias y con un valor Q de 3.715 se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Para evaluar el Índice de Viabilidad se aplicó una prueba de Kruskal- Wallis y con un valor p de 0.00 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras; al realizar una comparación de rangos de medianas con el fin de observar cuáles tratamientos tenían diferencias estadísticamente significativas se observan dos grupos con un valor Z de 2.64 , los tratamientos de 10 y 15% de SFB no presentan diferencias estadísticas entre sus medianas pero si las presentan con respecto a los tratamientos del 20 y 30% de SFB, posiblemente porque poseen los mayores índices de viabilidad (Figura 16). Después de realizar el análisis se eligió el Suero Fetal Bovino en concentración de 20% para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*.

4.2.5. Medio de Cultivo

Se evaluaron dos medios de cultivo utilizados comúnmente en citogenética. El medio de cultivo TC 199 es altamente enriquecido producido exclusivamente para el crecimiento y multiplicación de líneas celulares normales (Ham y Mckeehan, 1979) y el medio RPMI 1640 es un medio enriquecido utilizado para el cultivo en monocapas de células de humanos con leucemia (Anexo 3) (INVITROGEN, 2005).

Los tratamientos evaluados con medio RPMI 1640 presentaron un alto índice de viabilidad pero un bajo índice de estimulación (Figura 17) debido a la gran cantidad de aminoácidos y vitaminas, elementos necesarios dentro del proceso de división, sin embargo estos no son suficientes para permitir la proliferación celular. Sin embargo con el medio TC 199 se obtuvieron mayores índices de estimulación (Figura 17) que con el medio RPMI 1640 debido posiblemente a que este medio se encuentra más enriquecido, ya que está compuesto de una mayor cantidad de aminoácidos y de vitaminas, aunque estas últimas se encuentran en menor concentración comparadas con las que se encuentran presentes en el medio RPMI 1640 (Anexo 3).

Se realizaron las pruebas estadísticas para el Índice mitótico, el índice de estimulación y el índice de viabilidad mediante pruebas t observando diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios evaluados con un valor p de 0.00 para todos los tres índices analizados. De este análisis se concluye que el medio de cultivo óptimo para linfocitos de *Caretta caretta* es el TC 199 ya que presenta los índices mitóticos más altos; posiblemente porque posee (6) vitaminas adicionales (Ácido ascórbico, Alfa-tocoferol Fosfato, Vitamina K3, Ácido nicotínico, Vitamina A y Vitamina D2) (Anexo 3) que pueden ser indispensables en el ciclo celular de linfocitos de *Caretta caretta*.

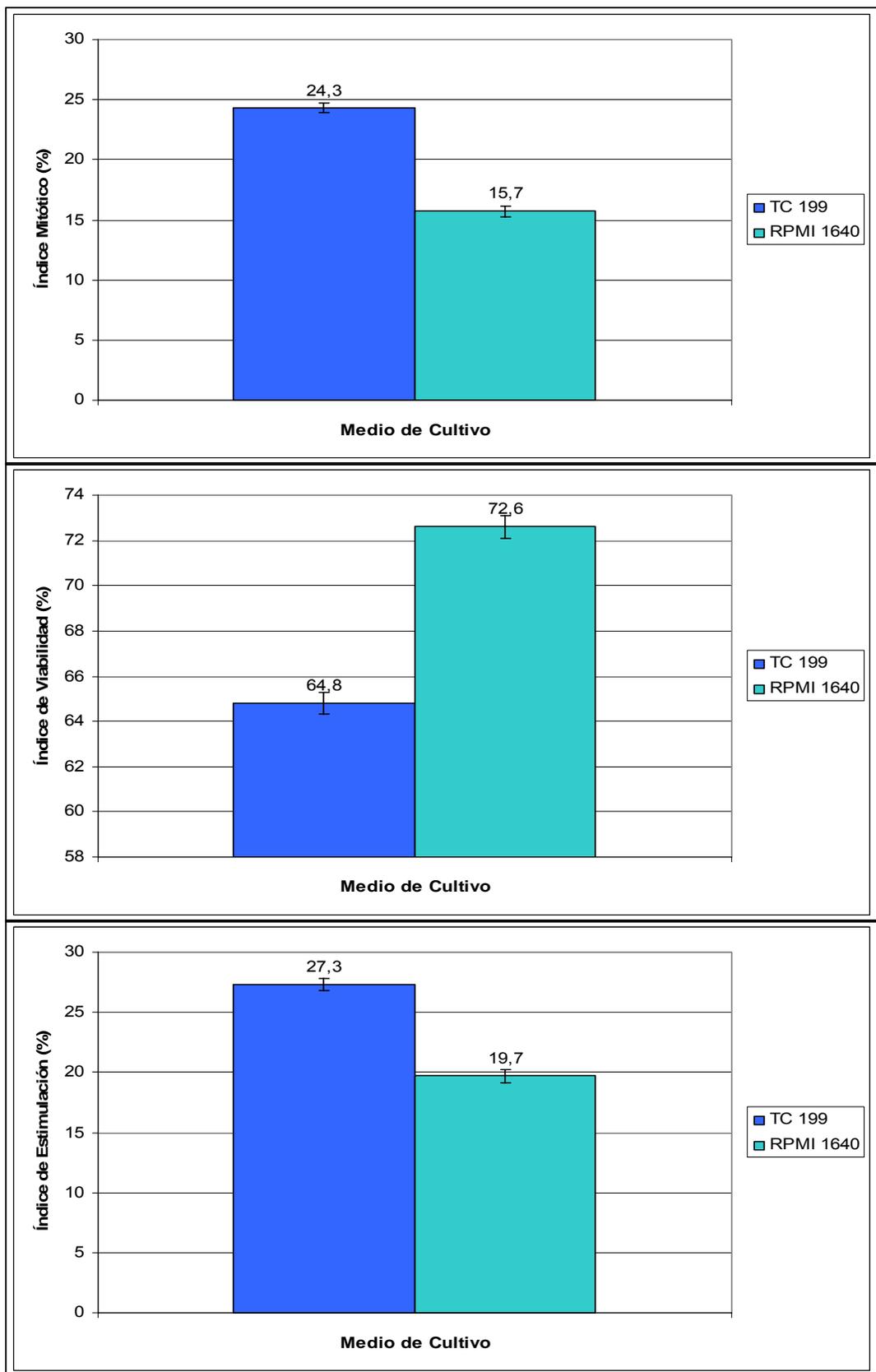


Figura 17. Indicadores para evaluar el medio de cultivo *in vitro* para linfocitos de *Caretta caretta*. IM: Índice Mitótico, IE: Índice de Estimulación, IV: Índice de viabilidad. n laminas observadas = 15

4.2.6. Temperatura de Incubación

Se evaluaron diferentes temperaturas de incubación con el fin de encontrar la temperatura óptima para el cultivo *in vitro* de linfocitos de *Caretta caretta*. Teniendo en cuenta que las tortugas marinas son animales poiquiloterms (carecen de termorregulación corporal) se escogió como máxima temperatura 37°C y como mínima 24°C, temperatura descrita en la sangre de ejemplares de *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* (Hochscheid *et al.*, 2002).

En el rango de temperaturas de 24-32°C se obtuvieron células en metafase, el mayor índice mitótico se obtuvo a los 32°C y a temperaturas mayores a esta (37°C) se inhibe el crecimiento celular para este tipo de animales (Alvarez-Leon, 2001). La temperatura descrita como corporal para tortugas marinas mostró un bajo índice mitótico, pero un alto índice de viabilidad.

Se realizaron las pruebas estadísticas para el Índice mitótico, el índice de estimulación y el índice de viabilidad mediante pruebas de ANOVA evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados con un valor p de 0.00 para los dos índices. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para observar entre cuáles tratamientos se presentaban las diferencias y con un valor Q de 3.960 se reportaron diferencias significativas entre las cinco temperaturas evaluadas. De acuerdo con el análisis la temperatura ideal para el cultivo *in vitro* de linfocitos de *Caretta caretta* es 32°C, obteniéndose el mayor índice mitótico y una de los mayores índices de estimulación y viabilidad (Figura 18).

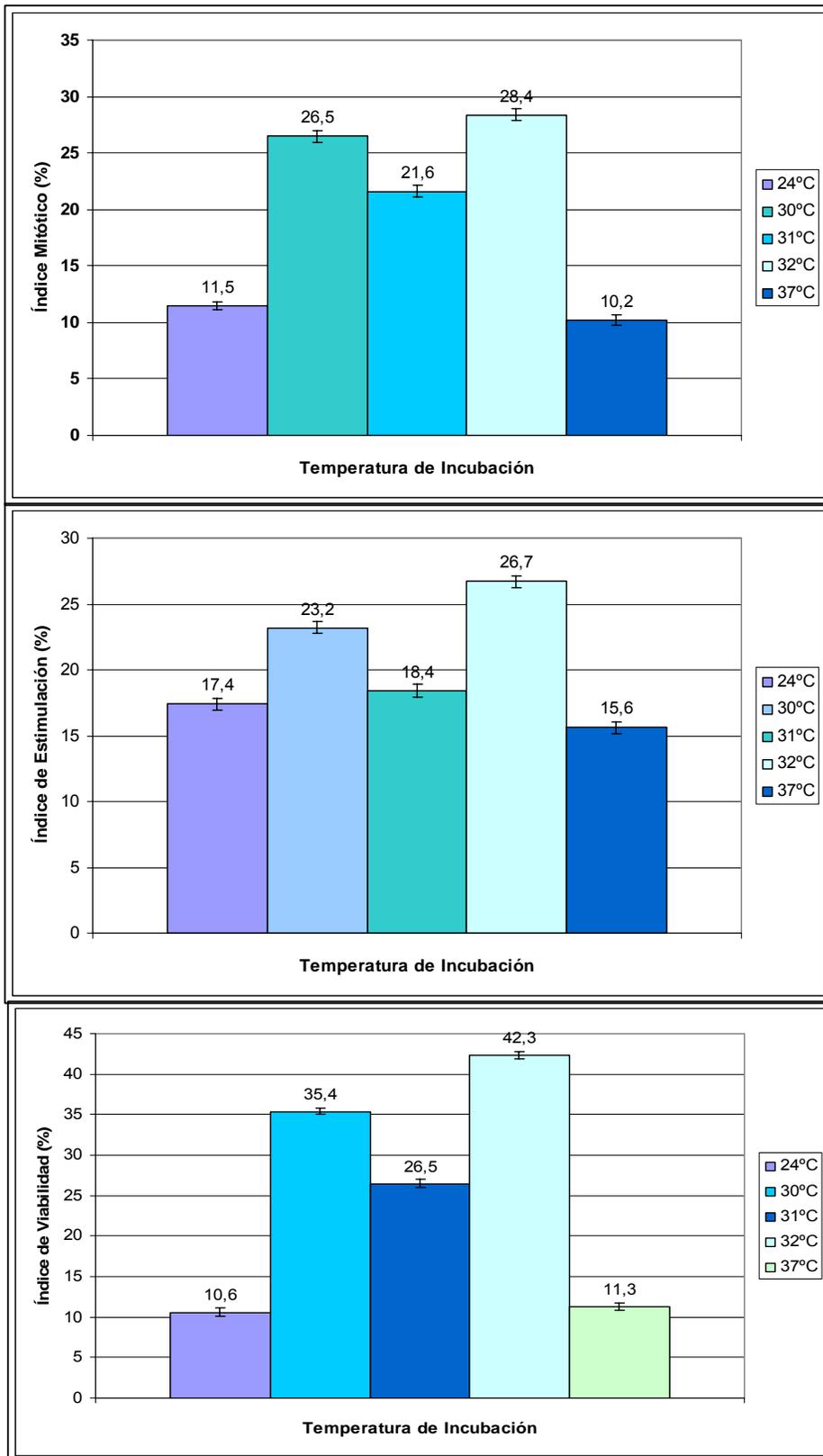


Figura 18. Indicadores para evaluar la temperatura de incubación para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*. IM: Índice Mitótico, IE: Índice de Estimulación, IV: Índice de Viabilidad. n laminas observadas =15.

4.2.7. Tiempo de Incubación

Los estudios que se han realizado en tortugas marinas y que involucran cultivo de linfocitos son experimentos para determinar la respuesta inmunológica ante enfermedades o presiones ambientales (Morgan *et al.*, 2002; Cray *et al.*, 2001) y por lo tanto, no tienen en cuenta el pico de crecimiento de células blancas. En estas investigaciones las muestras incubadas se recolectaban después de 24 y 48 horas respectivamente obteniendo células en metafase; sin embargo, el número de células que se describen en estos estudios posiblemente coincide con un crecimiento moderado pero no con el pico máximo de proliferación celular.

Teniendo en cuenta estas investigaciones, en el presente estudio se evaluaron tiempos de incubación desde 94 hasta 97 horas, con el fin de determinar en que momento se encuentra el pico de proliferación celular (Figura 19). Este rango se estableció teniendo en cuenta los estudios realizados en tortugas dulceacuícolas. Para la especie *Podocnemis vogli*, se describe el máximo de proliferación de células a las 94 horas (Ortiz y Rodríguez, 2003) y para la especie *Trachemis scripta* a las 96 horas (Ulsh *et al.*, 2001).

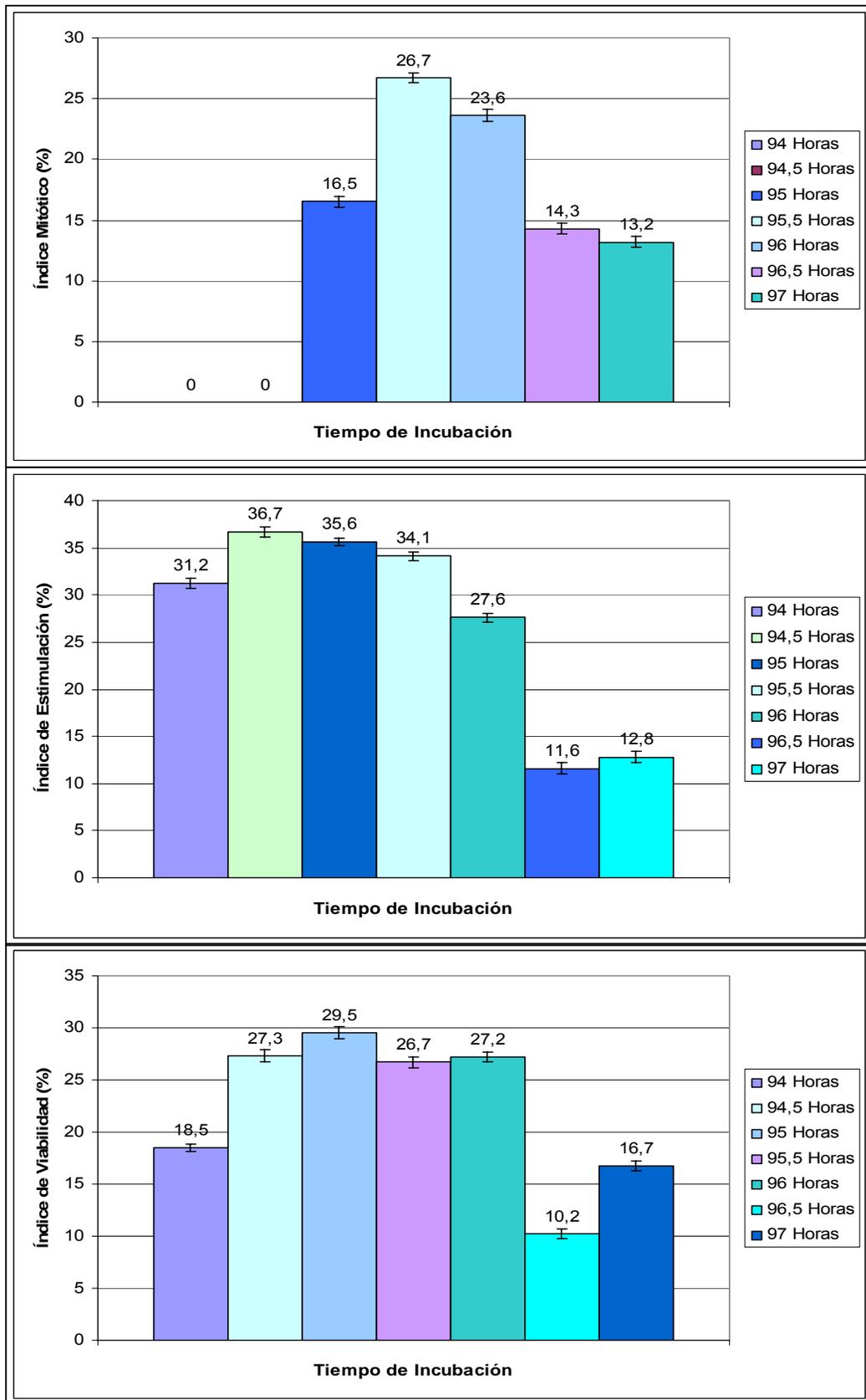


Figura 19. Indicadores para evaluar el tiempo de incubación para el cultivo *in vitro* de linfocitos de *Caretta caretta*. IM: Índice Mitótico, IE: Índice de Estimulación, IV: Índice de viabilidad. n laminas observadas =15

Durante todo el estudio se observó un índice de viabilidad de las células homogéneo durante las 5 primeras horas (94 hasta 96 horas), posteriormente se observa una disminución en las células viables; a su vez, se hace evidente un decrecimiento de las células estimuladas desde las 96 hasta las 97 horas (Figura 19). Esta disminución de células coincide con los descritos para la especie *Trachemis scripta* después de las 84 horas de cultivo (Ulsh *et al.*, 2001); con lo cual, se podría inferir una tasa metabólica más lenta en las tortugas dulceacuícolas que en tortugas marinas para la primera generación de células mitóticas. En las muestras colectadas a las 94 y 94.5 horas, no se observan células en mitosis, pero a partir de las 95 horas el índice mitótico empieza a incrementarse y logra el punto máximo de proliferación celular a las 95.5 horas. Se observó posteriormente un declive constante del índice mitótico hasta las 97 horas (Figura 19).

Se realizaron las pruebas estadísticas para evaluar el Índice mitótico de la temperatura de incubación mediante una prueba ANOVA evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados con un valor p de 0.00, posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para observar entre cuales tratamientos se presentaban las diferencias y con un valor Q de 3.960 se reportaron cinco grupos, el primero conformado por el tratamiento de 97 horas, el segundo el tratamiento de las 96.5 horas, el grupo tres esta compuesto por las tres primeras horas de incubación (94, 94.5 y 95 horas), el grupo cuarto corresponde al tratamiento de 96 horas y el ultimo grupo es el correspondiente a las 95.5 horas donde ocurre el pico de proliferación celular.

La temperatura de incubación en cuanto al índice de estimulación se analizó mediante una prueba ANOVA evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados con un valor p de 0.00. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey y con un valor Q de 4.257 se observó que existían diferencias significativas entre las siete horas evaluadas.

Por último la temperatura de incubación se analizó de acuerdo índice de Viabilidad mediante una prueba ANOVA y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados con un valor p de 0.00, al aplicar la prueba de Tukey se observa la formación de cinco grupos: el primero corresponde las 96.5 horas, el segundo grupo es el tratamiento de las 97 horas, el tercer es el tratamiento de las 94 horas, el cuarto grupo esta compuesto por compuesto por las muestras de las 94.5, 95.5, 96 horas, el último grupo corresponde a las 95 horas de incubación. Después de realizar los análisis se determinó que el tiempo de incubación óptimo para el cultivo de linfocitos de *Carteta caretta* es de 95.5 horas.

4.2.8. Inhibidor Mitótico (Colchicina)

La colchicina es un alcaloide que se encuentra en las semillas y en los bulbos de *Colchicum autumnale*, planta floreada de la familia de las liliáceas conocida desde hace siglos, esta afecta a las células en división de tal forma, que a la separación de las cromátidas de cada cromosoma no sigue la migración de las mismas hacia los polos opuestos, porque el efecto de la misma es inhibir la formación del huso acromático al unirse a la tubulina; al no haber movimiento de las cromátidas a los polos no se establecen las corrientes citoplásmicas que determinan la formación de la membrana celular que se formará entre las dos células hijas; por tanto, la mitosis da lugar a la duplicación del complemento cromosómico completo (DPAUPN, 2004).

Al realizar ensayos con diferentes concentraciones de colchicina, se encontró que a concentraciones de 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$ no se observaba ninguna célula en metafase, por lo cual la colchicina no estaba teniendo ningún efecto sobre el huso mitótico, ya que el índice de viabilidad y estimulación eran altos y aun así las células no eran detenidas en metafase (Tabla 7). La única concentración que permitió la despolimerización de los microtubulos del huso acromático y la

observación de células en metafase fue la de 50 µg/ml adicionando un volumen de 0.2 ml para una concentración final de 4% (Tabla 7).

Tabla 7. Concentraciones y tiempos de exposición al inhibidor mitótico en cultivo *in vitro* de linfocitos de *Caretta caretta*. n laminas observadas=15.

Concentración colchicina (µg/ml)	Tiempo de exposición (minutos)	Clasificación
20	30	Ausencia de metafases
	40	
	45	
	50	
30	30	Ausencia de metafases
	40	
	45	
	50	
50	30	Metafases baja condensación
	40	Metafases baja condensación
	45	Metafases óptimas
	50	Metafases óptimas y de alta condensación

También se evaluaron diferentes tratamientos variando el tiempo de exposición del inhibidor mitótico (Tabla 7) observándose cromosomas con un grado de condensación óptima a los 45 minutos de exposición (Figura 20A). En menores tiempos de exposición (30 y 40 min.) se observaron metafases de baja condensación (Figura 20B) y en 50 minutos de exposición también se observaron cromosomas en alta condensación (Figura 21). Después de realizar los análisis se determinó que el inhibidor mitótico en concentración de 50 µg/ml con un tiempo de exposición de 45 minutos permite observar metafases de *Caretta caretta* adecuadamente.

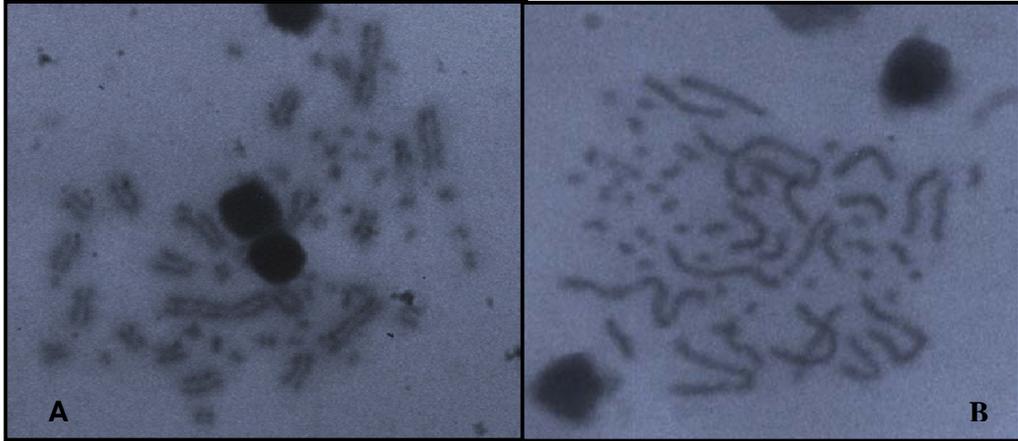


Figura 20. A. Metafase de *Caretta caretta* en óptima condensación B. Metafase en baja condensación.



Figura 21. Metafase de *Caretta caretta* en alta condensación.

4.2.9. Solución Hipotónica

Para poder obtener buenas preparaciones citológicas, se hace necesario producir un aumento en el volumen celular por medio de un tratamiento que acreciente la turgencia celular mediante osmosis antes de realizar la fijación (Silva *et al.*, 1991). Todo esto se realiza con el fin de asegurar una buena dispersión de los cromosomas dentro de la célula.

Se utilizó solución de cloruro de potasio (KCl) en diferentes concentraciones como solución hipotónica y se evaluaron diferentes tiempos de exposición (Tabla 8). En los ensayos realizados con concentraciones menores a 0.05 M se observan metafases incompletas y lisis celular (Tabla 8), posiblemente por el aumento tan drástico en la turgencia celular debido a las bajas concentraciones de solución hipotónica que hace que el paso de agua a través de la membrana celular sea muy grande y la célula se lise (Alzota, 2001).

Tabla 8. Concentraciones y tiempos de exposición de la solución hipotónica en cultivo *in vitro* de linfocitos de *Caretta caretta*. n laminas observadas=15

Concentración KCl (M)	Tiempo de exposición (minutos)	Clasificación
0.02	45	Metafases incompletas y lisis celular
0.03	45	
0.04	45	
0.05	30	Cromosomas separados
	40	
	45	Metafases cerradas
	50	
0.06	45	
0.07	45	

Debido a estos resultados en la concentración de 0.05M se probaron cuatro tiempos de exposición (Tabla 8) y no se continuaron evaluando tiempos con otras concentraciones de KCl. En la concentración de 0.05 M con tiempo de exposición de 40 minutos se observan cromosomas separados (Tabla 8 y Figura 22), mientras que en concentraciones y tiempos de exposición mayores las metafases observadas son cerradas (Figura 23); es posible que la falta de cromosomas completamente separados se deba a una baja velocidad de difusión del solvente.

Después de realizar el análisis se determinó que la solución hipotónica de KCl en concentración de 0.05 M y con un tiempo de exposición de 40 minutos permite una adecuada observación de cromosomas de *Caretta caretta* separados para determinar su morfología.

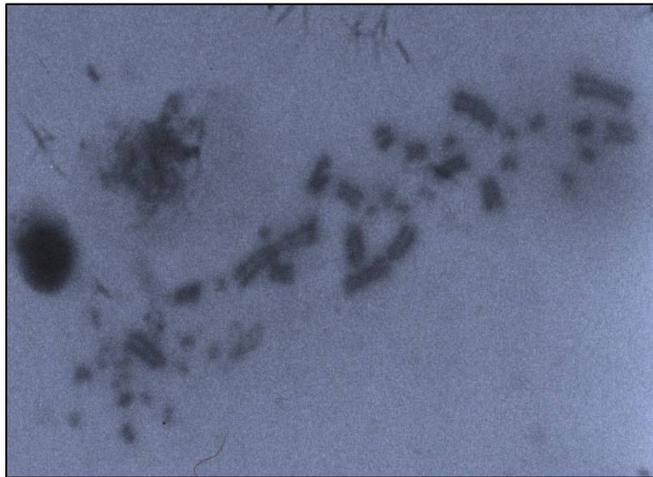


Figura 22. Metafase de *Caretta caretta* donde se observan cromosomas separados.

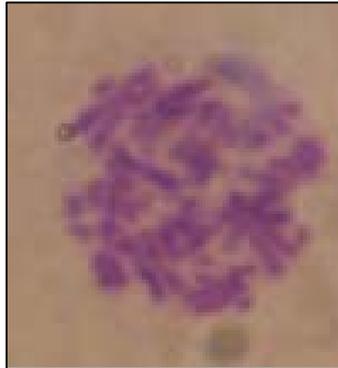


Figura 23. Metafase de *Caretta caretta* cerrada.

4.2.10. Fijador (Carnoy)

El último paso es la fijación, que se realiza mediante la coagulación o precipitación de las proteínas (albúminas) de las membranas celulares, haciéndolas insolubles e induciendo la aparición de uniones con otras proteínas. Esta insolubilización puede ser producida por la deshidratación, coagulación y principalmente la combinación química del reactivo fijador con las proteínas celulares (Alzota, 2001). En citogenética se utiliza generalmente carnoy como solución fijadora, esta mezcla permite que los núcleos se tiñan bien. Es una mezcla de ácido acético glacial, que conserva bien los núcleos celulares y de metanol, que disuelve los lípidos, precipita el glucogeno sin fijarlo y da con los nucleoprotidicos un precipitado hidrosoluble. También fija levemente los citoplasmas (Alzota, 2001) y permite extraer los residuos celulares, manteniendo la membrana celular intacta hasta el proceso de extensión de las láminas, lo cual permite una identificación fácil de los cromosomas en metafase (Ortiz y Rodríguez, 2003).

Se evaluaron diferentes concentraciones y tiempo de fijación realizando prefijaciones con carnoy en concentración metanol: ácido acético glacial 6:1 como se recomendó para *Podocnemis vogli*, evitando que el cambio de medio fuera drástico para las células (Ortiz y Rodríguez, 2003) y tres lavados con carnoy 3:1. Las laminas obtenidas presentaron una cantidad baja de residuos citoplasmáticos, por lo cual, se implemento este procedimiento para fijar las laminas (Tabla 9). En los tratamientos donde se utilizó carnoy 6:1 durante todo el procedimiento se observaron residuos celulares y las metafases presentaban un halo de citoplasma que impedía la adecuada visualización de los cromosomas (Tabla 9, Figura 24A) mientras que en el tratamiento en el cual se utilizaba carnoy 3:1 durante la prefijación se observaron metafases sin el halo pero los residuos citoplasmáticos continuaban observándose en las laminas (Tabla 9, Figura 24B).

Tabla 9. Tratamientos utilizados para evaluar el fijador carnoy en cultivo *in vitro* de linfocitos de *Caretta caretta*. n laminas observadas=15

No.	Prefijación	Fijación 1	Fijación 2	Fijación 3	Clasificación
1	5 min. 6:1	10 min. 6:1	30 min. 6:1	15 min. 6:1	Metafases con halo de citoplasma y residuos celulares
2	5 min. 6:1	10 min. 3:1	30 min. 3:1	15 min. 3:1	Metafases sin halo de citoplasma ni residuos celulares
3	5 min. 3:1	15 min. 3:1	15 min. 3:1	15 min. 3:1	Metafases sin halo de citoplasma con residuos celulares

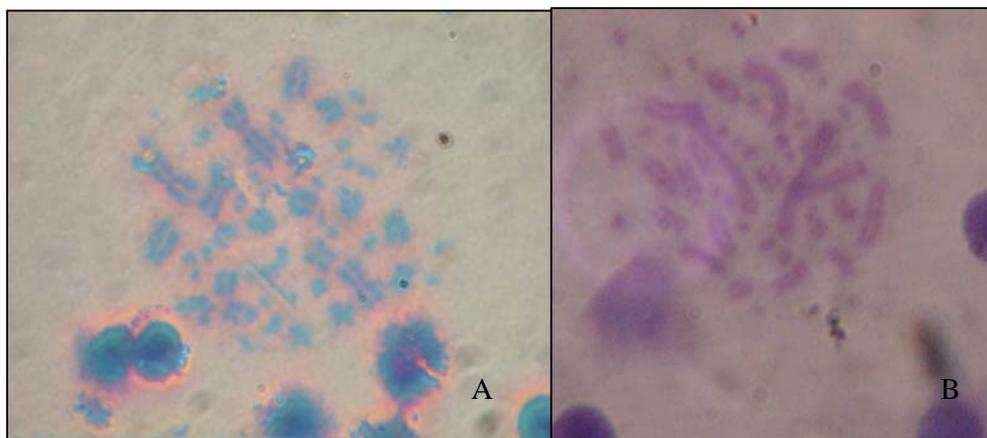


Figura 24. A. Metafase con halo de citoplasma y residuos celulares, B. Metafase sin halo de citoplasma con residuos celulares.

Después de realizar el análisis se determino que el tratamiento adecuado para linfocitos de *Caretta caretta* consiste en una prefijación de 5 minutos con carnoy 6:1 seguida de 3 fijaciones con carnoy 3:1 con tiempos de exposición de 10, 30 y 15 minutos respectivamente.

En la Tabla 10 se presenta las variables óptimas para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta*, el número de tratamientos y de láminas observadas para evaluar cada una de las variables analizadas en el estudio.

Tabla 10. Variables óptimas para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta* determinados en el presente estudio. n= número de laminas observadas.

Variable	Tratamiento	No. Tratamientos	n
Obtención del Plasma	3 Centrifugaciones 1 min. a 500 rpm	75	20
Volumen de inoculación de plasma enriquecido en linfocitos	0.5 ml	20	20
Mitógeno	PHA-P (100000 µg/ml, 0.4 ml)	60	20
SFB	20%	60	20
Medio de cultivo	TC 199	20	15
Temperatura de incubación	32°C	75	15
Tiempo de incubación	95.5 horas	17	15
Inhibidor mitótico	Colchicina (50 µg/ml, 0.2 ml)	12	15
Tiempo de Inhibidor mitótico	45 min.		15
Solución Hipotónica	KCl (0.05M)	9	15
Tiempo de Sol. Hipotónica	40 min.		15
Fijador	6:1- 3:1	4	15
Tiempo de Fijador	5-10-15-30 min.		15

En la Tabla 11 se resume el protocolo establecido para la obtención de metafases de *Caretta caretta* a partir de cultivo *in vitro* de linfocitos obtenidos de sangre periférica, generando así una técnica no invasiva que permite el análisis citogenético de esta especie de tortugas marinas.

Tabla 11. Protocolo Estandarizado para la obtención de metafases de *Caretta caretta* a partir de sangre periférica.

1. Recolectar entre 1 y 10 ml de sangre de *Caretta caretta* teniendo en cuenta la relación de masa del individuo y volumen de recolección, en tubos *Vacutainers* con heparina sodica.
2. Centrifugar a 500 rpm durante 1 minuto.
3. Retirar el sobrenadante y la primera capa de células rojas en condiciones de asepsia.
4. Verter el sobrenadante en un tubo de centrifuga estéril y centrifugar a 500 rpm por 1 minuto.
5. Retirar el sobrenadante y la primera capa de células rojas.
6. Verter el sobrenadante en un tubo de centrifuga estéril y centrifugar a 500 rpm por 1 minuto.
7. Retirar solo la capa de células blancas y el sobrenadante.
8. Verter el sobrenadante en un tubo de centrifuga estéril
9. Tomar 1 ml del plasma y agregar 1 ml de Suero Fetal Bovino
10. Tomar 0.5 ml del plasma enriquecido y verterlo en un frasco de cultivo que tenga 4 ml de Medio TC 199, 0.2 ml de penicilina, 0.4 ml de Fitohemaglutinina de 100.000 μ g/ml y 1 ml de SFB .
11. Incubar durante 95.5 horas a 32°C
12. Agregar 0.2 ml de colchicina de 50 μ g/ml, agitar suavemente e incubar a 32°C durante 45 minutos.
13. Pasar el contenido a un tubo de centrifuga estéril y centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
14. Descartar el sobrenadante con una pipeta pasteur plástica teniendo cuidado con el botón de células blancas.
15. Soltar el botón celular con golpes suaves en las paredes del tubo y adicionar 10 ml de KCl 0.05M (mantenida a 32°C) e incubar durante 40 minutos
16. Adicionar 1 ml de Carnoy frío 6:1. Tapar el tubo y mezclar suavemente por inversión tres o cuatro veces. Esperar durante 5 minutos.
17. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
18. Retirar el sobrenadante y descartarlo.
19. Adicionar 5 ml de Carnoy frío 3:1, resuspender con la pipeta para homogenizar durante 5 minutos y esperar 10 minutos a temperatura ambiente.
20. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
21. Retirar el sobrenadante y descartarlo.
22. Adicionar 5 ml de Carnoy frío 3:1, resuspender con la pipeta para homogenizar durante 5 minutos y esperar 30 minutos a temperatura ambiente.
23. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
24. Retirar el sobrenadante y descartarlo.
25. Adicionar 5 ml de Carnoy frío 3:1, resuspender con la pipeta para homogenizar durante 5 minutos y esperar 15 minutos a temperatura ambiente.
26. Retirar el sobrenadante y descartarlo.
27. Agregar 2 ml de fijador y homogenizar con la pipeta.
28. Extender las laminas a una distancia de 2 metros del distancia
29. Tefiir con una solución de Giemsa preparada recientemente.
30. Observar al microscopio

4.3. Cariotipo de *Caretta caretta*

El cariotipo observado coincide con el descrito por Kamesaki en 1989 en cuanto al número de cromosomas diploides para *Caretta caretta*: 56 cromosomas: 32 macrocromosomas y 24 microcromosomas (Figura 25). En la publicación de Kamesaki se describe el cariotipo de *Caretta caretta* con 12 cromosomas metacéntricos, 2 submetacéntricos, 6 subtelocéntricos y 12 acrocéntricos; sin embargo, en esta investigación se encontraron 16 metacéntricos, 8 submetacéntricos, 4 subtelocéntricos, 4 acrocéntricos (Figura 25, 26 y 27, Tabla 12) resultado que no concuerda con la clasificación dada por Kamesaki (1989) para cada par de cromosomas. Posiblemente por la falta de herramientas tecnológicas para clasificar de una forma más eficiente los cromosomas, ya que el artículo de Kamesaki fue publicado en 1989 y no se especifica cual criterio de clasificación empleo ni que ayuda tecnológica utilizó; más adelante se discute más a fondo este resultado y se analiza las posibles causas.

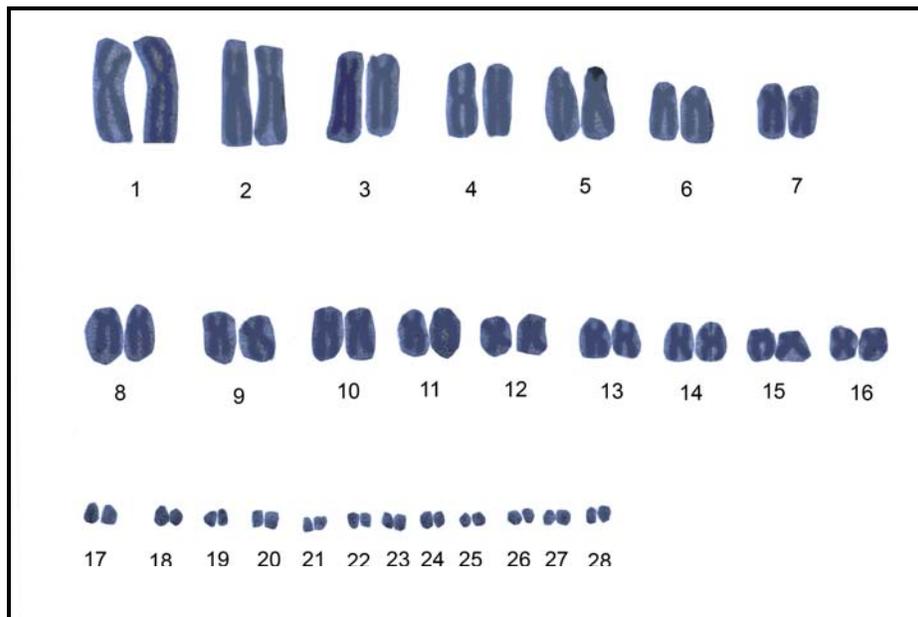


Figura 25. Cariograma de *Caretta caretta* en coloración Giemsa.

4.3.1. Ideograma del conjunto cromosómico de *Caretta caretta*

Se realizaron las mediciones de los cromosomas para formar el ideograma de *Caretta caretta* y se observó que el grupo A esta compuesto por doce (12) pares de cromosomas de mayor tamaño (Figura 26). Los pares 2,4, 9, 10, 11, 12,13 y 14 son metacéntricos con relaciones de brazos entre 1.2 y 1.6, el índice centromérico vario entre 39 y 44.9. Los pares 1, 5, 6 y 7 son submetacéntricos con una relación de brazos entre 1.7 y 2.3 y un índice centromérico entre 29.9 y 37.3 (Figura 25 y 26, Tabla 12).

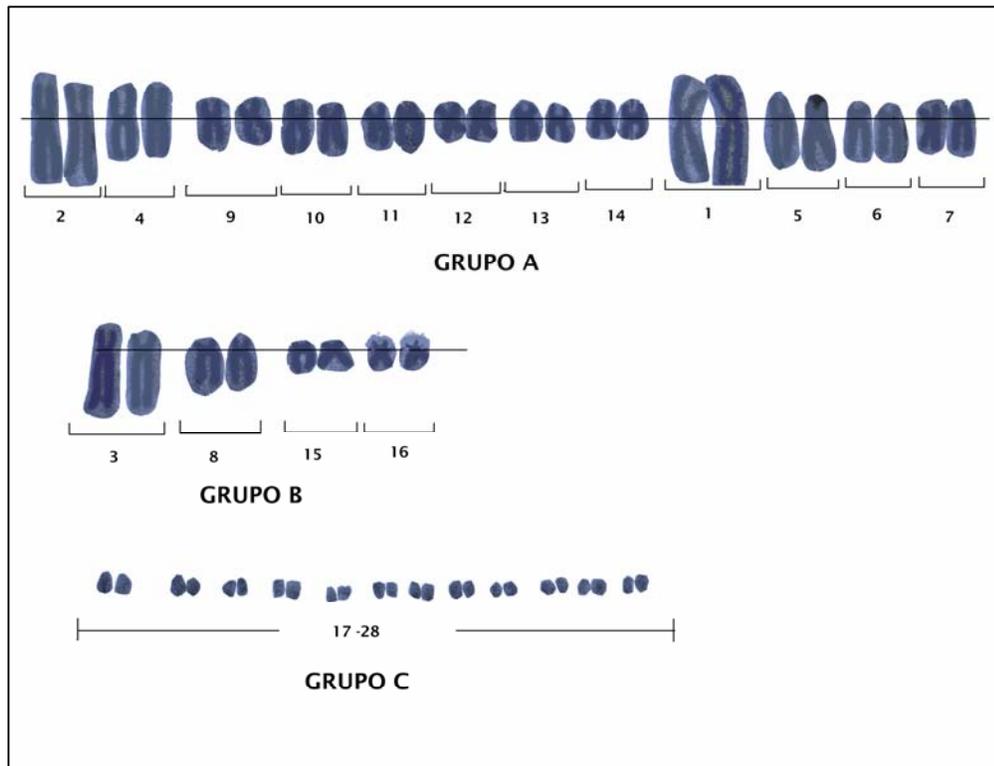


Figura 26. Cariograma de *Caretta caretta* mostrando la posición centromérica.

El Grupo B esta compuesto por los cromosomas medianos y pequeños; conforman este grupo cuatro (4) pares de cromosomas (Figura 26 y 27, Tabla 12). Los pares 3 y 8 son subtlocéntricos con relaciones de brazos entre 1.8 y 2.1, el índice centromérico varió entre 23.3 y 24.1. Los pares 15 y 16 son

acrocéntricos con relaciones de brazos de 1.3 y 1.6 el índice centromérico varió entre 12 y 12.5 (Figura 26 y 27, Tabla 12).

El Grupo C esta conformado por los microcromosomas cuya posición centromérica es difícil de observar. Dentro de este grupo hay 12 pares de cromosomas. No se observaron cromosomas sexuales (Figura 26 y 27, Tabla 12).

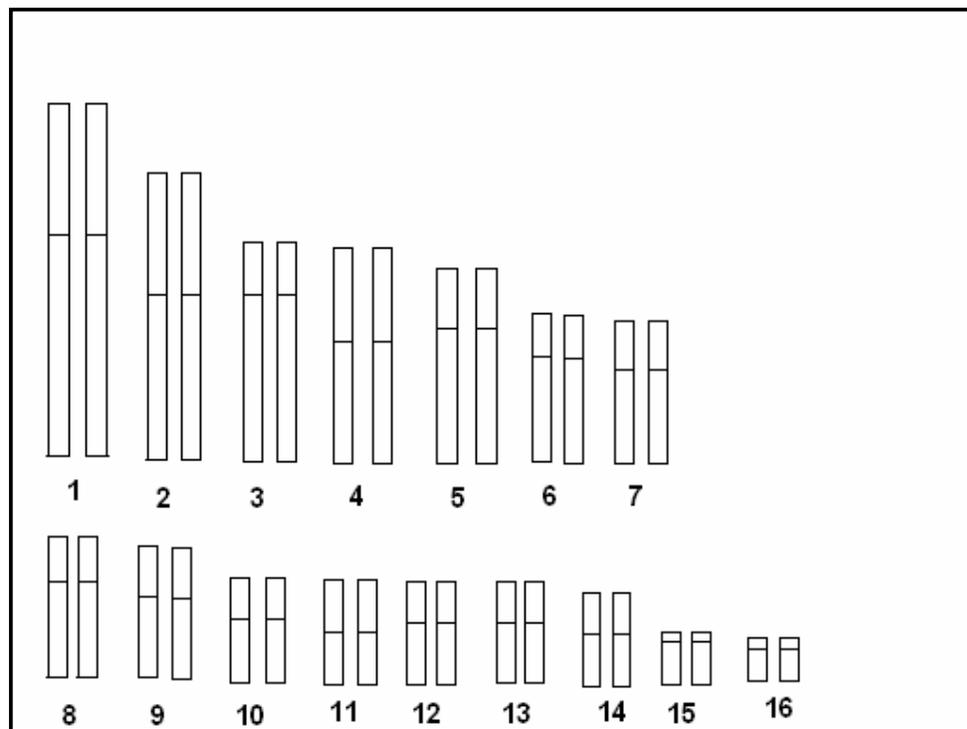


Figura 27. Ideograma del complemento cromosómico de *Caretta caretta*.

Es importante aclarar que el análisis de imágenes mediante el computador permite una clasificación más exacta de los cromosomas y que mediante esta técnica en asocio con los índices generales de clasificación cromosómica formulados en el pasado (Levan *et al.*, 1964; Bickham, 1975), en este estudio se logró realizar por primera vez el ideograma de una tortuga marina.

Tabla 12. Parámetros de evaluación del complemento cromosómico para la elaboración del ideograma de *Caretta caretta*. n laminas observadas=20 pertenecientes a 12 individuos de *Caretta caretta*.

Pareja de Cromosomas	q1*	q2*	q*	p1*	p2*	P*	Relación de Brazos*	Clase de Cromosoma	Longitud total de los cromosomas*	Índice Centromérico*	Longitud relativa de los cromosomas*	Longitud relativa del brazo q*	Longitud relativa del brazo p*
1	2,0	2,2	2,1	1,4	1,1	1,3	1,7	Submetacéntrico	3,4	37,3	12,9	8,1	4,8
2	1,7	1,4	1,6	1,1	1,2	1,2	1,3	Metacéntrico	2,7	42,6	10,5	6,0	4,5
3	1,6	1,6	1,6	0,5	0,5	0,5	3,2	Subtelocéntrico	2,1	24,1	8,0	6,0	1,9
4	1,2	1,1	1,2	1,0	0,8	0,9	1,3	Metacéntrico	2,0	43,5	7,9	4,4	3,4
5	1,3	1,3	1,3	0,6	0,6	0,6	2,2	Submetacéntrico	1,9	31,3	7,1	4,9	2,2
6	1,0	1,0	1,0	0,4	0,4	0,4	2,3		1,4	29,9	5,4	3,8	1,6
7	0,9	0,8	0,9	0,5	0,4	0,5	1,9		1,4	35,1	5,2	3,4	1,8
8	1,8	1,0	1,4	0,4	0,5	0,4	3,3	Subtelocéntrico	1,8	23,3	6,9	5,3	1,6
9	0,8	0,7	0,8	0,6	0,4	0,5	1,5	Metacéntrico	1,2	39,4	4,8	2,9	1,9
10	0,8	0,9	0,8	0,6	0,5	0,5	1,6		1,4	39,0	5,3	3,2	2,1
11	0,6	0,7	0,6	0,6	0,4	0,5	1,3		1,1	43,2	4,4	2,5	1,9
12	0,7	0,5	0,6	0,3	0,5	0,4	1,5		1,0	39,7	3,7	2,2	1,5
13	0,6	0,5	0,6	0,4	0,4	0,4	1,3		1,0	43,0	3,7	2,1	1,6
14	0,6	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	1,2		0,9	44,9	3,4	1,9	1,5
15	1,5	1,3	1,4	0,2	0,2	0,2	7,0		Acrocéntrico	1,6	12,5	6,1	5,4
16	1,0	1,2	1,1	0,1	0,2	0,2	7,3		1,3	12,0	4,8	4,2	0,6
									26,1				

* Valores dados en Promedio

4.3.2. Cambios cromosómicos en *Caretta caretta*

Aunque esta no es una investigación de carácter poblacional se tuvieron en cuenta para el análisis algunos aspectos de la historia de vida de esta especie que han sido evidenciados por medio de estudios de genética molecular y que podrían relacionarse con los cambios cromosómicos observados en esta investigación con respecto a la descripción cariológica dada por Kamesaki para *Caretta caretta*. También es importante aclarar que aunque este investigador no describe claramente cual fue la técnica utilizada para obtener el cariotipo, en el artículo se describe la inoculación *in vivo* del inhibidor mitótico para obtener metafases; debido a que esta técnica no permite obtener diferentes grados de condensación en los cromosomas, en el presente estudio mediante la técnica de cultivo de linfocitos, fue posible observar diferentes metafases en el mismo grado de condensación lo cual permite clasificar los cromosomas de una forma más efectiva. Las hipótesis que se plantean a continuación intentan exponer posibles causas que podrían explicar los cambios cromosómicos observados en esta investigación:

1. En el estudio realizado por Bickham en 1981 se analizó la evolución cariotípica en tortugas y concluyó que la tasa de evolución del cariotipo en estas es desacelerada y especialmente en la Familia Cheloniidae, ya que no se han presentado reorganizaciones cromosómicas dentro de esta. Este autor también relaciona la evolución cariotípica con las estrategias de reproducción, vagilidad y tallas de la población. En consecuencia la

disminución en la tasa de evolución tanto morfológica como cromosómica es un patrón que sugiere una efectiva evolución adaptativa de estas especies. Por lo tanto presiones sobre estas especies como la depredación de los huevos, el consumo de tortugas adultas o juveniles y la acumulación de desechos orgánicos e inorgánicos en las proximidades de las playas de anidación, ocasionan una reducción en la población y cambios en los habitats que utilizan estas especies, lo cual podría verse reflejado en algún tipo de especiación cromosómica como una adaptación de la especie.

2. Otra explicación podría estar relacionada con la descripción de dos subespecies de *Caretta caretta* determinadas por su distribución geográfica *C. c. caretta* (Linnaeus, 1758) en el Océano Atlántico y *C. c. gigas* (Deraniyagala, 1945) en el Océano Pacífico. Las diferencias entre las tortugas observadas en las dos áreas geográficas se basan en el número de placas marginales en el caparazón (7-12 y 7-8 respectivamente) aunque esta clasificación morfológica no es aceptada por algunos científicos ya que los rangos se sobrelapan (Lambert, 1999). También se han demostrado pequeñas divergencias mediante análisis de DNA mitocondrial entre las tortugas *Caretta caretta* que habitan en el océano Atlántico y el Pacífico, aunque se reporta una colonia del Océano Índico, la baja diversidad del linaje de DNA mitocondrial de esta colonia en la cuenca del Atlántico, refleja una reciente colonización de este (Bowen, 1996). Este marco referencial podría explicar las diferencias en el cariotipo descrito por Kamesaki (1989) y el encontrado en esta investigación; debido a que las muestras analizadas en el primer estudio fueron colectadas en el Pacífico (Japón) y el presente estudio es el primero realizado en el Atlántico (Colombia) que cuenta con la descripción completa de la morfología cromosómica.

3. A parte de las subespecies descritas, el aislamiento genético, la separación biogeográfica y la reducción de las poblaciones, es posible que una de las estrategias adaptativas de esta especie sea el intercambio genético con otras especies de la familia que produce de esta forma individuos híbridos viables. En este aspecto desde 1940 se ha reportado la existencia de híbridos, Lewis en ese año describe un híbrido entre *Eretmochelys imbricata* y *Caretta caretta* en las islas Caiman y en la misma localidad se observo un híbrido entre *Chelonia mydas* y *Eretmochelys imbricata* (Hendrickson, 1980). Kamesaki (1983) describió en la península de Chita Japón, híbridos entre *Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata*, híbridos de estas dos especies también fueron descritos en Brasil (Conceição *et al.*, 1990; Bass *et al.*, 1996; Marcovaldi *et al.*, 1997) y mediante un análisis electroforetico y de proteínas se concluyo que eran híbridos de segunda generación (Conceição *et al.*, 1990). También se han descrito híbridos con esta característica o de generación mas antigua ya que presentaban combinación de DNA nuclear y DNA mitocondrial lo cual indica que son híbridos de primera generación (Bowen *et al.*, 1996) entre *Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata* en Florida y entre *Caretta caretta* y *Lepidochelys kempii* en la bahía de Chesapeake, Estados Unidos (Karl *et al.*, 1995). La existencia de estos híbridos es extraordinaria porque las tribus Caretini (*Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys kempii*) y Chelonini (*Chelonia mydas* y *Natator depressus*) (Bowen *et al.*, 1993) reflejan una división antigua entre la familia Cheloniidae, que datan de por lo menos 50 millones de años (Avice *et al.*, 1992). El incremento en la frecuencia de hibridación entre especies en vía de extinción o entre estas y especies no amenazadas puede marcar un acelerado decrecimiento y extinción de alguna taxa sensible (Karl, 1996); sin embargo, es importante que sea considerado dentro de los planes de manejo y conservación esta parte de la historia de vida de las especies en estudio, ya que las predicciones acerca

del impacto de la hibridación natural en poblaciones son difíciles de hacer (Bowen y Karl, 1997). Se plantea la necesidad de identificar molecularmente individuos para aclarar si el cariotipo encontrado en esta investigación es de híbridos o de líneas puras de *Caretta caretta*.

4. El modelo de especiación de White (1973, 1978) sugiere que los reordenamientos cromosómicos tienen ventaja selectiva en estado homocigoto y argumenta que para que se produzca este mecanismo, las especies deben presentar baja vagilidad para tener la capacidad de formar poblaciones aisladas. Dentro de los factores más importantes que favorecen la fijación de estos cambios estructurales se encuentran la deriva genética y la endogamia; este último, es el de mayor relevancia para las tortugas marinas ya que se ha demostrado filopatria tanto de hembras como de machos de estas especies (FitzSimmons *et al.*, 1997). Los cambios en la morfología de los cromosomas de *Caretta caretta* también podrían explicarse por diferencias cromosómicas acumuladas entre los híbridos si es que se presentan en el Caribe colombiano.

5 CONCLUSIONES

1. El número de células blancas por microlitro de *Caretta caretta* promueve la competencia por los factores proteicos extracelulares en los cultivos *in vitro*, por lo tanto, se deben usar volúmenes de inoculación de plasma enriquecido con una concentración de 0.5 ml .
2. Se observa el pico máximo de proliferación celular para los linfocitos de *Caretta caretta* a las 95.5 horas de incubación a 32°C.
3. El medio de cultivo óptimo para el cultivo de linfocitos de *Caretta caretta* es el TC 199, posiblemente porque posee mayor enriquecimiento vitamínico y una mayor concentración de aminoácidos esenciales que el medio RPMI 1640.
4. La fitohemaglutinina de 100.000 µg/ml adicionando 0.4 ml para una concentración final de 8%, estimula adecuadamente la respuesta proliferativa de los linfocitos de *Caretta caretta*.
5. La colchicina de 50 µg/ml adicionando un volumen de 0.2 ml para una concentración final del 4% y con un tiempo de exposición de 45 minutos inhibe la formación del huso acromático al unirse a la tubulina y permite una adecuada observación de los linfocitos de *Caretta caretta* en etapa de metafase.
6. Se observan metafases óptimas para el estudio cariológico de *Caretta caretta* al utilizar KCl en concentración de 0.05M durante 40 minutos debido a que bajas concentraciones de solución hipotónica hace que el

paso de agua a través de la membrana celular sea mayor que con concentración de 0.05M y la célula se lise y en mayor concentración se puede presentar una baja velocidad de difusión.

7. El cariotipo observado para *Caretta caretta* en Santa Marta, presenta un número de cromosomas diploides de 56; clasificados 32 macrocromosomas de los cuales 16 pares son metacéntricos, 8 submetacéntricos, 4 subtelocéntricos, 4 acrocéntricos y 24 microcromosomas.
8. En este estudio se realiza por primera vez el ideograma de una tortuga marina mediante la utilización de los índices generales de clasificación de los cromosomas y el análisis de imágenes por computador.
9. En este estudio se implementó una técnica no invasiva para la obtención de cariotipos de *Caretta caretta* que permite realizar investigaciones en citogenética, inmunología y toxicología.
10. El cambio en la morfología cromosómica de *Caretta caretta* descrita por Kamesaki y la encontrada en este estudio posiblemente se deba a falta de estudio sobre las subespecies descritas, debido a que las muestras analizadas en el primer estudio fueron colectadas en el Pacífico (Japón) y el presente estudio es el primero realizado en el Atlántico (Colombia) que cuenta con la descripción completa de la morfología cromosómica.
11. Presiones como la depredación de los huevos, el consumo de tortugas adultas o juveniles y la acumulación de desechos orgánicos e inorgánicos en las proximidades de las playas de anidación ejercidas sobre *Caretta caretta*, ocasionan una reducción en la población y cambios en los hábitats

que utilizan estas especies, lo cual posiblemente podría verse reflejado en algún tipo de especiación cromosómica como una adaptación de la especie.

12. Es posible que el cariotipo obtenido en este estudio pertenezca a híbridos de *Caretta caretta*, ya que las tortugas marinas generan estrategias adaptativas que incluyen el intercambio genético con otras especies de la familia, que produce de esta forma, individuos híbridos viables. *Caretta caretta* presenta la mayor cantidad de híbridos, evidenciando de esta forma el potencial de plasticidad genética que presenta esta especie dentro de la familia.

13. Los cambios en los cromosomas de *Caretta caretta* podrían explicarse por diferencias cromosómicas acumuladas entre los híbridos ya que el modelo de especiación de White sugiere que los reordenamientos cromosómicos tienen ventaja selectiva en estado homocigoto y para que se produzca este mecanismo las especies deben presentar baja vagilidad para tener la capacidad de formar poblaciones aisladas; las cuales son características de *Caretta caretta*.

RECOMENDACIONES

1. Se deben realizar futuras investigaciones encaminadas a realizar un análisis cariológico mediante el bandeo de cromosomas en localidades diferentes, que permitan determinar cambios entre áreas de anidación o alimentación.
2. Teniendo en cuenta que en el rango espacial donde se han descrito híbridos se encuentra el Caribe colombiano y que en esta área no hay estudios genéticos de estas especies, se plantea la necesidad de identificar molecularmente individuos para aclarar si el cariotipo encontrado en esta investigación es de híbridos o de líneas puras de *Caretta caretta*.

6 BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ-LEON, R. 2001. Las tortugas marinas de Colombia: estado actual de su conocimiento. Rev. Acad. Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. 25 (9): 269-286.

ALZOTA, R. 2001. Guía de estudio técnicas histológicas. UNCPBA. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Biológicas. www.vet.unicen.edu.ar/catedras/cHistologia/Tecnicashistologicas.PDF.

AVISE, J.C., BOWEN, B.W., LAMB, T., MEYLAN, A. B., BERMINGHAM, E. 1992. Mitochondrial DNA evolution at turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the testudines. Molecular Biology Evolution. 9(3):457-473.

BASS, A.L., GOOD, D.A., BJORNDAL, K.A., RICHARDSON, J.I., HILLIS, Z.M., HORROCKS, J.A., AND BOWEN, B.W. 1996. Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. Mol. Ecol. 5:321-328.

BICKHAM, J.W. 1975. A cytosystematic study of turtles in the genera Clemys, Mauremys and Sacalia. Herpetologica.31: 198-204.

BICKHAM, J.W., BAKER, R.J. 1976. Karyotypes of some Neotropical turtles. Copeia. 4: 703-708.

BICKHAM, J.W., BJORNDAL, K.A., HAIDUK, M.W., RAINEY, W. E. 1980. The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). Copeia.3: 540-543.

BICKHAM, J.W. 1981. Two Hunder Million old chromosomes: Declaration of the rate of karyotypic evolution in turtles. Science. 212: 1291-1293.

BICKHAM, J.W., CARR, J.L. 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of Cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. Copeia.4: 918-932.

BJORNDAL, K. A. 1997. Foraging Ecology and Nutrition of Sea Turtles. En: The Biology of Sea Turtles. p: 199-231.

- BLANCO, A. 1982. Cariotipo de la especie *Phyllobates subpunctatus* (Anura: Cystignathidae). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Basicas, Programa de Pregrado de Biología. Trabajo de Grado. Bogotá.
- BOLTEN, A., JACOBSON, E.R., BJORNDAL, K.A. 1992. Effects of Anticoagulant and Autoanalyzer on Blood Biochemical Parameters of Loggerhead Sea Turtles, *Caretta caretta*. Amer. J. Vet. Res. 53:2224-2227.
- BOWEN, B. W., NELSON, W.S., AVISE, J.C. 1993. A MOLECULAR PHYLOGENY FOT MARINE TURTLES: Tait mapping, rate assessment and conservation relevance. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 5574-5577.
- BOWEN, B.W., KAMESAKI, N., LIMPUS, C. J., HUGLES, G. H., MEYLAN, A. B., AVISE, J.C. 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicate by mitochondrial DNA haplotypes. Evolution. 48:1820-1826.
- BOWEN, B. W. 1996. Comparative biogeography of the green turtle (*Chelonia mydas*) and the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as inferred from mtDNA sequence comparasions En: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), Proceedings of the International Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics, NOAA Techincal memorandum NMFS-SEFSC-396.173.
- BOWEN, B.W., KARL. S.A. Population genetics, phylogeography and molecular evolution. 1997. En: LUTZ, P.L., MUSICK, J. A. The Biology of Sea Turtle. CRC Press; New York. pp. 29-50.
- BOWEN, B. FITZSIMMONS, N. MORTIZ, C. Identificación de Poblaciones. 2000. En: ECKERT, K. L., BJORNDAL K. A., ABREU-GROBOIS, F.A& DONNELLY, M. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. Publicación 4. 278 p.
- BRUCE, A., DENNIS, B., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. 1996. Biología Molecular de la Célula. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 1378.
- BUENO, M. L. 2003. Importancia de la caracterización genética de especies silvestres en zoológicos, unidades de rescate de fauna y centros de acopio. Lyonia. 3 (1): 45-56.
- CONCENÇÃO, M. B., LEVY. J. A., MARINS. L.F, MARCOVALDI. M.A.1990. Electrophoretic characterization of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 97B, No. 2:275-278.

- CONSEJO DEL PROGRAMA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. 1997. Plan Estratégico (1997-2002). COLCIENCIAS. Colombia. p. 25-52.
- CRAY, C., VARELLA, R., BOSSART, G.D., LUTZ, P. 2001. Altered in vitro immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 32 (4): 436-440.
- DARNELL, J. LODISH, H. BALTIMORE, D. 1988. *Biología celular y molecular*. Editorial Labor S.A. Barcelona, España.
- DESSAURE, H. C. 1970. Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. En: GAMS, C. *Biology of the reptilian*. 3: 1-71.
- DÍAZ, I., SONDON, M., BAHR, P., ESCALONA, A. 2003. Estudio de la influencia del suero equino en el crecimiento de mielomas murinos. Facultad de Ciencias Médicas de Holguín.
- DODD, C.K. Jr. 1988. Sinopsis of the biological data on the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758). U.S. Fish Wildl. Ser. Biol. Rep. 88 (14). 110 p.
- DUGUY, H. E.,. 1985. Reptilian immunity: Factors affecting immune responses. En: GAMS, C. *Biology of the reptilian*. 14: 601-615.
- DUTTON, P. 1996. Methods for collection and preservation of simple for sea turtle genetic studies, p. 17-24. En: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics*, NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396.173.
- ECKERT, K. L., BJORNDAL K. A., ABREU-GROBOIS, F.A& DONNELLY, M. 2000. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. Publicación 4. 278 p.
- ENGSTROM, T. MEYLAN, P., MEYLAN, A. 2002. Origin of juvenile loggerhead (*Caretta caretta*) in a tropical developmental habitat in Caribbean Panamá. *Animal Conservation*. 5: 125-133.
- ERNST, C.H, LOVICH, J.E., BARBOUR, W. 1994. *Turtles of the United States and Canada*. Smithsonian Inst. Press, Washington and London. 578 p.

FITZSIMONS, N., LIMPUS, C., NORMAN, J., GOLDIZEN, A., MILLER, J., MORTIZ, C. 1997. Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 8912-8917.

GALBREATH, D.A. 1993. Multiple paternity and sperm storage in turtles. Herpetological Journal. 3: 117-123.

GRIFFITHS, A. MILLER, J. SUZUKI, D. LEWONTIN, R. GELBART, W. 1993. Introducción al análisis genético. Mc. Graw. Hill. Madrid, España.

HAM, R. C., McKEEHAN, W. L. 1979. Media and growth requirements. En: JAKOBY, W. B., PASTAN, I. H. Cell Culture. Academic Press. San Diego. USA.

HARMS, C.A., KELLER, J.M., KENNEDY-STOSKOPF, S. 2000. Use of a two-step Percoll® gradient for separation of loggerhead sea turtle *Caretta caretta* peripheral blood mononuclear cells. J Wildl Dis. 36: 535-540.

HENDRICKSON. J.R. 1980. The ecological strategies of sea turtles. American Zoology. 20, 597-608.

HERNÁNDEZ, P. D., MARTÍN O., RODRÍGUEZ Y., GANEN, F. A. 1999. Estudio de la fitohemaglutinina proveniente del frijol colorado (*Phaseolus Vulgaris*). Rev Cubana Hepatología, Inmunológica Hemoter. 5(3):210-14.

HOCHSCHEID S., F. BENTIVEGNA, J.R. SPEAKMAN. 2002. Regional blood flow in sea turtles: implications for heat exchange in an aquatic ectotherm. Physiological and Biochemical Zoology. 75 (1): 66-76.

HUGHES, G.R. 1974. The sea turtles of south-east Africa. II. The biology of the Tongaland loggerhead turtle *Caretta caretta* with comments on the leatherback turtle *Dermochelys coriacea*, and de green turtle *Chelonia mydas* in the study region. Inv. Rep. Oceangr. Res. Int. Durban. 36: 1-96.

INVEMAR. 2000. Programa Nacional de Investigación en Biodiversidad Marina y Costera. PNIBM. Editado por Juan Manuel Díaz Merlano y Diana Isabel Gómez López. Santa Marta: INVEMAR, FONADE, MMA. p. 83.

INVEMAR, Determinación de la distribución y del estado de conservación de las tortugas marinas en el Caribe colombiano. Informe Final. Convenio SECAB SECAB-INVEMAR, Santa Marta, Colombia. 2002.

INVITROGEN. www.catalog.invitrogen.com. Fecha de consulta: Mayo de 2005.

JACOBSON, E.R., MANSELL, J.L., SUNDBERG, J. P., HAJJAR, L., REICHMANN, M.E., EHRHART, L.M., WALSH, M., MURRU, F. 1989. Cutaneous Fibropapillomas of Green Turtles. J. Comp. Path. 101:39-52.

KARL, S.A., BOWEN, B. W., AVISE, J. C. 1995. Hybridization among the ancient mariners: characterization of marine turtle hybrids with molecular genetic markers. Journal Heredity. 86(4): 262-268

KAMESAKI, N. 1983. The possibility of hibridization between the loggerhead turtle, *Caretta Caretta* and the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in specimens hatched from eggs collected in Chita Peninsula. Japan Journal Herpetology. 10:52-53.

_____. 1989. Karyotypes of the loggerhead turtle, *Caretta caretta*, from Japan. Zoological Science. 6: 421-422.

_____. 1990. Karyotype of the Haswkbill Turtle, *Eretmochelys imbricata*, from Japan, with notes on a method for preparation of Chromosomes from liver cells. Japanese Journal of Herpetology. 13(4):111-113.

KARL, S.A., BOWEN, B. W., AVISE, J. C. 1995. Hybridization among the aient mariners: caracteization of marine turtle hybrids with molecular genetic markers. Journal Hered. 86(4):262-268.

_____. 1996. Hybridization and taxonomy of marine turtles: anonymous nuclear DNA sequence analyses. En: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), Proceedings of the International Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics, NOAA Techincal memorandum NMFS-SEFSC-396.173.

KILLEBREW, F.C. 1975. Mitotic chromosomes of turtles: the pelomedusidae. Journal Herpetology. 9:281-285.

LAMBERT, J. 1999. "Caretta caretta" (On-line), Animal Diversity Web. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Caretta_caretta.html.

LEVAN, A.K. FREDGA, A. SANDBERG, B. 1964. Nomenclature for centroméric position on chromosome. Hereditas. 52: 201-220.

LEWIS, C. 1940. The Cayman Islands and marine turtles. En: The Herpetology of the cayman island. Bulletin Japan Science Series. 2, 156-155.

LIMPUS, C.J. 1985. A study of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in eastern Australia. Ph. D. Dissertation, University Queensland, Australia.

MACLEOD, A.J. 1988. The use of plasma protein fractions as medium supplements for animal cell culture. *Advances in Biochemical*. 37: 41-56.

MAECHA, S. 1998. Caracterización citogenética de *Rhinoclemmys diademata* (Mertens, 1954) (Testudina: Emididae). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Trabajo de Grado. Bogotá.

MADER, D.R. 1996. *Reptile Medicine and Surgery*. Saunders, Philadelphia. pp 512

MARCOVALDI, M.A., GODFREY, M.H., AND MROSOVSKY, N. 1997. Estimating sex ratios of loggerhead turtle in Brazil from pivotal incubation duration. *Can. J. Zool.* 75:755-770.

MEDRANO L., DORIZZI, M. ROMBLOT, F., PIEAU, C. 1987. Karyotype of the sea turtle *Demochelys coriacea* (Vandelli, 1761). *Amphibia- Reptilia*. 8: 171-178.

MENDOCA, M.T. 1981. Comparative growth rates of wild immature *Chelonia mydas* and *Caretta caretta* in Florida. *Journal Herpetological*. 15: 447- 451.

MORGAN, D.A., CLASS, R., SOSLAU, G. 2002. Cytokine mediate proliferation of sea turtle peripheral blood cells in suspension cultures. *Veterinary Medicine and Diseases*. 22nd Annual Symposium on sea turtle biology and conservation. USA. pp 307-308.

MORTIMER, J, PRITCHARD, P. 2000. Taxonomía, Morfología externa, e Identificación de especies. En: ECKERT, K. L., BJORNDAL K. A., ABREU-GROBOIS, F. A & DONNELLY, M. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. Publicación 4. 278 p.

MOULIS, R.A. 1994. *Caretta caretta* (loggerhead sea turtle). *Diurnal Nesting*. *Herpetol. Rev.* 25: 119-120.

NAKAMURA, K. 1973. On the chromosomes of some chelonians (a preliminary note) *Japan Journal Genetic*. 13:240.

_____. 1949. A study in some chelonians with notes on chromosomal formula in the *Chelonia*. *Kromosoma*. 5: 205-213.

NORRGARD, J. GRAVES, J. 1996. Determination of natal origin of a juvenile loggerhead turtle (*Caretta caretta*) population in Chesapeake Bay using mitochondrial DNA analysis. En: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), Proceedings of the International Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics, NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396.173.

ORTIZ, M. RODRIGUEZ, P. 2003. Estudio citogenético de la tortuga "sabanera" (*Podocnemis vogli*. Müller, 1953)(Testudinata: Podocnemidae). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Trabajo de Grado. Bogotá.

OWENS, D. W., RUIZ, G. J. 1980. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtle. *Herpetologica*. 36 (1): 17-20.

PECCININI-SEALE, D. 1981. New developments in vertebrate cytogenetics. *Cytogenetic Studies in reptiles*. *Genetica*. 56: 123-148.

PNCTMCC. 2002. Ministerio de Medio Ambiente-Dirección General de Ecosistemas. Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales en Colombia. Bogotá, Colombia.

PRITCHARD, P.C.H. 1976. Living turtles of the world. T.F.H. Publication., Inc, Jersey City, New Jersey. 288 p.

PRITCHARD, P.C.H., TREBBAU, P. 1984. Turtles of Venezuela. *Soc. Stud. Amphib. Rept.* 403 p.

PRITCHARD, P.C.H. 1988. The loggerhead in Guyana. *Marine Turtle Newsletters*. 43:6-7.

RANDALL, D., BURGGREN, W., FRENCH, K. 2002. *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. Fifth edition. Freeman and Company. New York. USA. Pp. 727.

SAENZ, F; CARDOZO, H. 1978. *Genética Básica y biología de los cromosomas*. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Secretaría Organización de Estados Americanos. La Plata, Argentina.

SALAMANCA, F. 1993. *Citogenética Humana. Fundamentos y aplicaciones clínicas*. Editorial Médica Panamericana. México.

- SAMBROOK, J., RUSELL, D. 2001. Molecular Cloning: a laboratory Manual. Vol 3. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- SANTANDER, R. 1976. Introducción a la citogenética humana. Aguilar Ediciones. Madrid, España.
- SILVA, E. CRANE, C. BERMUDEZ, A. BUENO, M. PEDRAZA, X. GIRALDO, A. 1991. Citogenética Humana, manual de procedimientos. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de salud. Bogotá, Colombia.
- SOLARI, A. 2000. Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- THORSON, T. B. 1968. Body fluid partitioning in reptilia. Copeia. 3:592-601.
- ULSH, V.A., CONGDON, J.D., HINTON, T.G., WHICKER, F.W., BEDFORD, J.S. 2001. Culture methods for turtle lymphocytes. Methods in Cell. Science. 22: 285-297.
- URIESTE, J. 2001. Curso de Formación de Guías para la observación de cetáceos. Charla de Tortugas Marinas. Canarias, España.
- VAN BUSKIRK, J. CROWDER, B. 1994. Life-history variation in marine turtles. Copeia. 66-81.
- WHITE, M. J. D. 1973. Animal cytology and evolution. 3ª Ed. Cambridge University Press, London.
- WHITE, M. J. D. 1978. Modes of Speciation. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 455 pp.
- WIBBELS, T. OWENS, D.W., LIMPUS, C.J., REED, P.C., AMOSS, M.S. 1990. Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating and nesting in the loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Gen. Comp. Endocrinol. 79: 154- 164.
- WIBBELS, T. 2000. Determinación del sexo de tortugas marinas en hábitats de alimentación. En: ECKERT, K. L., BJORN DAL K. A., ABREU-GROBOIS, F.A & DONNELLY, M. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. Publicación 4. 2000. 278 p.

WINTREY, M. R., ROTT, M.A., WORTMAN, A.T. 1997. Unraveling DNA: Molecular biology for the laboratory. Prentice Hall Inc. USA.

WODD, F.G. 1953. Mating behaviour of captive loggerhead turtles, *Caretta caretta*. Copeia. 184:186.

WORK, T. M., RASKIN, R. E., BALAZS, G. H., WHITTAKER, S.D. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. American Journal Veterinary Research. 59: 1252-1257.

YILDIRIM, A. 1998. The role of Serum on the adhesion of cultured Chinese hamster lung (CHL) cells. Journal of Medical Science. 28: 383-387.

YNTEMA, C.L., MROSOVSKY, N. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. Canadian Journal Zoology. 60: 1012-1016.

www.cassiopeaonline.it/immagini/cromosoma.html.2004

www.dfnavarra.es/salud/anales/textos/Vol25/n3/revis1a.htm.2005

www.gonow.to/evolutionibus.2004

7 ANEXOS

ANEXO 1

1. *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758)

1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA (Eckert *et al.*, 2000)

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Tetrapoda
Clase	Reptilia
Subclase	Anapsida
Orden	Testudines (Linnaeus, 1758)
Suborden	Casichelydia (Gaffney 1975)
Infraorden	Cryptodira (Cope, 1868)
Superfamilia	Cheloniodea (Baur, 1893)
Familia	Cheloniidae
Género	<i>Caretta</i> (Rafinesque, 1814)
Especie	<i>caretta</i> (Linnaeus, 1758)



1.2. CARACTERES TAXONÓMICOS

Caretta caretta es una tortuga marina de gran tamaño que puede alcanzar los 123 cm, pero típicamente mide de 85 a 100 cm. Posee cinco o más pares de escudos costales, el primero más pequeño en el caparazón, y tres pares de escudos inframarginales en el plástron. El caparazón es ancho en la parte anterior y aserrada en la parte posterior. Se pueden observar un promedio de 12 a 13 pares

de escudos marginales en cada lado pero varía de 11 a 15, todos periféricos, pero el noveno y el décimo par se encuentran separados por las costillas (Figura 1 y 2). (Mortimer y Pritchard, 2000). El borde marginal posterior del caparazón es aserrado en juveniles, pero se pule a medida que pasan los años; y presenta una coloración castaño rojizo pero puede teñirse con verde; los borde de los escudos a menudo son de color amarillo (Pritchard, 1967). También se puede observar una elongación en la parte media del caparazón que progresivamente se va puliendo con los años. (Mortimer y Pritchard, 2000).

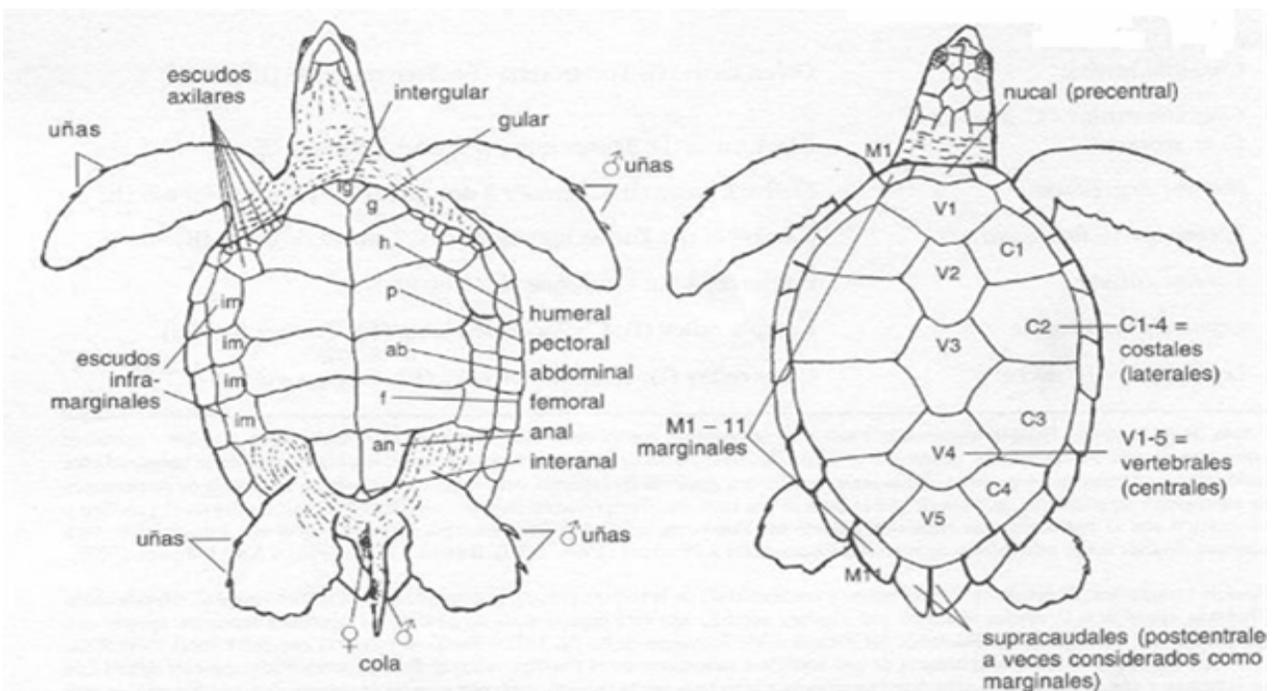


Figura 1. Rasgos morfológicos externos de las tortugas, incluyendo los escudos del plástron (izquierda) y del caparazón (derecha). Se pueden observar los escudos intergular, gular, humeral, pectoral, abdominal, femoral y anal aunque el escudo intergular es muy pequeño y puede estar ausente (Mortimer y Pritchard, 2000).

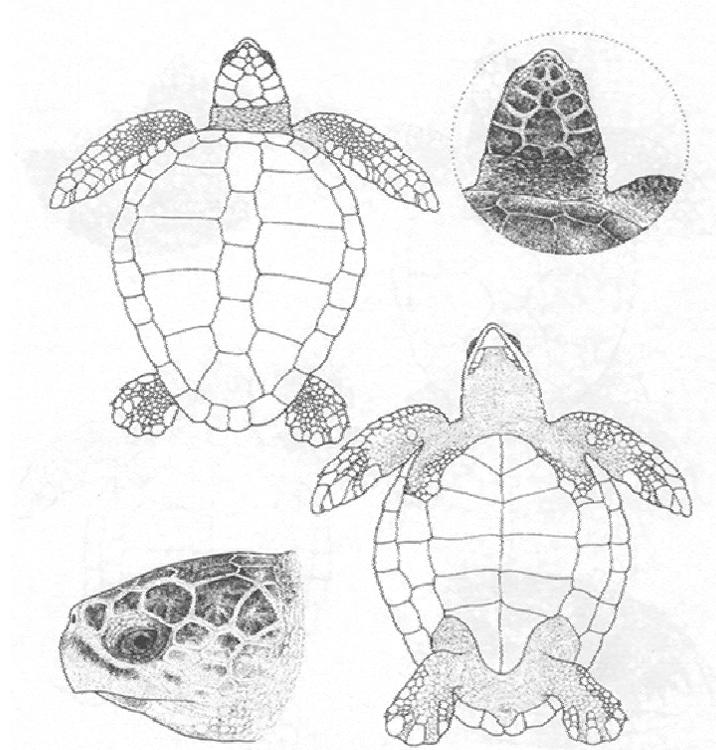


Figura 2. Tortuga cabezona (*Caretta caretta*). Caparazón: ancho en el margen posterior de los juveniles, cinco pares de escudos costales con el primer par más pequeño. Longitud recta del caparazón de 105 cm. Cabeza: grande y triangular, ancho de hasta 28 cm, dos pares de escamas prefrontales. Extremidades: Aletas delanteras relativamente cortas, dos uñas en cada aleta. Plástron: tres pares de escudos inframarginales (Mortimer y Pritchard, 2000).

La cabeza es grande, ancha en la parte posterior y redondeada en la parte anterior. Presenta un hocico corto y ancho; dos pares de escamas prefrontales y tres postoculares. La coloración varía de rojizo a amarillo verdoso o variando en la escala del amarillo (Figura 5). Presenta aletas delanteras cortas con dos uñas en cada extremidad; estas y la cola son medianamente oscuras y amarillas

lateralmente y por debajo. Los adultos pesan aproximadamente de 100 a 150 kg (Pritchard, 1967).

1.3. DISTRIBUCIÓN

Caretta caretta se encuentra en los Océanos Pacífico, Atlántico e Indico, en Washington, Japón, India, Kenia, Islas Británicas, en la nueva tierra del sur de Chile, Australia, Sur África, África tropical del oeste y Argentina; también se puede encontrar en el mar Caribe y Mediterráneo (Pritchard, 1967) (Figura 3).



Figura 3. Distribución de *Caretta caretta* en el mundo. (Elaborado por Evelyn López Barrera, 2004)

Es la única tortuga marina con un rango de anidación que abarca más allá de los trópicos. Se han registrado anidaciones en Estados Unidos (New Jersey, sur de Florida y oeste de Texas), pero la mayoría de las anidaciones han sido en Carolina del Sur, Georgia, y Florida (Dodd, 1988; Ernst *et al.*, 1994). Se localizan otras playas de anidación en las aguas Atlánticas del Brasil, Guyana francesa, Surinam, Guyana, Venezuela, Colombia, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala, Belice, México, Trinidad y Tobago, Grenada, St. Lucía, República Dominicana, Cuba, Islas Caimán y las Bahamas (Dodd, 1988; Pritchard, 1988). En el Océano Pacífico se han registrado anidaciones en Japón, Australia oriental, Fiji, las Islas de Solomon, y México occidental (Pritchard, 1976).

1.4. HÁBITAT

La tortuga cabezona tiene un hábitat pelágico similar a la tortuga verde durante los primeros años de vida, es decir, flota en nudos de *Sargassum* en mar abierto o bajo objetos flotantes, y se han encontrado neonatos hasta los 240 km en el mar abierto; al alcanzar entre 40 (en el Atlántico) y 80 cm (Australia) de largo de caparazón se desplazan a aguas menos profundas para alimentarse tanto en suelos blandos como duros (Bjørndal, 1997). Los individuos adultos suelen vivir en zonas más costeras y las hembras comparten las playas de anidación con otras especies de tortugas marinas (Urioste, 2001).

La tortuga *Caretta caretta* presenta una alimentación omnívora; en los hábitats bénticos incluye una alta variedad de especies invertebrados tales como cangrejos, bivalvos (almejas, mejillones y ostras), anémonas, moluscos, ascidias, caballitos de mar, peces, gusanos, camarones, esponjas, hidroides, medusas (Physalia), poliquetos, cefalópodos (calamar y jibia), percebes, anfípodos e isópodos, erizos de mar, peces (huevos, juveniles, adultos de pez erizo, sardinas

y atún); incluso tortugas jóvenes (*Caretta*, *Malaclemys*); aunque especialmente aquellos invertebrados de caparazón duro que rompen con sus poderosas mandíbulas (Bjorndal, 1997).

También consumen algas (*Ascophyllum*, *Sargassum*, *Ulothrix*, *Urospora*), y plantas vasculares (*Cymodocea*, *Thalassia*, *Zostera*) (Dodd, 1988; Ernst *et al.*, 1994). Normalmente olfatean sobre los arrecifes del coral y lugares rocosos para hallar la comida, descubriendo la presa por el olor o visualmente (Bjorndal, 1997).

1.5. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Las tortugas de la especie *Caretta caretta* son capaces de migrar miles de kilómetros. Es posible que realicen desplazamientos transoceánicos cíclicos, ayudadas por las corrientes marinas que pueden durar varios años. Se estima que la esperanza de vida de estos animales podría superar los 100 años (Urioste, 2001).

La madurez sexual se produce entre los 10 y 30 años dependiendo de las condiciones ambientales del lugar donde se desarrolle. Prefieren salientes rocosas o arrecifes de baja profundidad para escoger sus playas de anidación ya que les sirve como orientación en el mar para realizar la ovoposición (INVEMAR, 2002). Las hembras pueden llegar a realizar varias puestas por temporada y depositar hasta 200 huevos en cada puesta. Después de este gran esfuerzo, una misma hembra puede tardar más de dos años en volver a reproducirse. Si la temperatura es adecuada los huevos tardan alrededor de 60 días en eclosionar (Urioste, 2001).

Según Dodd (1988), las longitudes promedio de largo recto del caparazón (LRC) en machos maduros es de 72 a 104 cm y las hembras maduras que se han

registrado anidando en varias playas presentan longitudes promedio de LRC de 79 a 96 cm (Dodd, 1988); estas dimensiones fueron tomadas en hembras totalmente maduras pero posiblemente la madurez sexual se logra con un LRC más corto, quizás de 60 o 70 cm (Hughes, 1974). Mendonca (1981), afirma que algunas tortugas *Caretta caretta*, en estado salvaje de Norteamérica, parecen alcanzar el tamaño de madurez en un rango de 10 a 30 años y se ha estimado que para los individuos en cautiverio se alcanza la madurez sexual entre los 16 y 17 años.

1.6. REPRODUCCIÓN

Wibbels y colaboradores (1990), encontraron que machos de Australia, durante los meses de enero a marzo presentan tubos seminíferos involucionados con solo espermatogonias, aunque también se pueden observar algunos espermatoцитos primarios y secundarios en abundancia, los tubulos presentan algunos espermatozoos en el lumen; la transformación de las espermatidas y espermatozoos se presentan en julio y después hasta octubre estas células son abundantes, con una máxima espermatogénesis en septiembre y noviembre. A final de Noviembre los espermatozoos son abundantes, pero las espermatidas y los espermatoцитos se reducen en número. Con respecto a las hembras, observaron que durante el año de anidación, presentan millones de folículos vitalogénicos de un diámetro de 1.5 cm durante los cuatro meses antes de la temporada de anidación; durante la ovulación los folículos ováricos presentan yemas de huevo que se agrandan aproximadamente hasta 3 cm de diámetro.

Aunque Pritchard y Trebbau (1984) afirmaron que "la cópula se realiza al principio de la estación de anidación", está puede ocurrir varios meses antes de que las tortugas lleguen a la playa a realizar la ovoposición (Dodd, 1988). El cortejo involucra un recorrido alrededor de la hembra por parte del macho y un

acercamiento por la parte posterior para morder el cuello y el hombro con el fin de unirse a ella (Limpus, 1985). El apareamiento ha sido observado durante las horas del amanecer y del anochecer pero indudablemente también ocurre en la noche. Las disputas de apareamiento de los machos copuladores se pueden extender por más de tres horas como afirma Wood (1953); estos rituales de cortejo ocurren en la superficie del agua, aunque la hembra está completamente sumergida, la parte más alta del caparazón del macho normalmente está fuera del agua.

El macho se agarra de los márgenes anterolaterales del caparazón de la hembra con la uña de cada extremidad anterior y de los márgenes posterolaterales con la uña de cada extremidad posterior y algunas veces muerde el cuello de la hembra (Galbreath, 1993). El macho alberga el pene en la cola, y durante el apareamiento la coloca en posición para que quede debajo suyo y toque la salida cloacal de la hembra. Los rangos de conducta de las hembras a la unión, se pueden observar desde la aceptación pasiva hasta la resistencia violenta. Las hembras tienen la capacidad de guardar el esperma durante algún tiempo, por lo tanto varios machos pueden contribuir con esperma para fecundar los huevos de una misma puesta (Galbreath, 1993).

La anidación se realiza principalmente en las playas de zona templadas (salvo las playas tropicales en el Caribe occidental) que pueden ser costas continentales o isleñas. La mayoría de las anidaciones se presentan en primavera y principios del verano después de realizar migraciones largas entre las áreas de alimentación y las playas (Mortimer y Pritchard, 2000). La mayoría de los nidos son excavados en la noche, pero de vez en cuando durante el día sobre la línea de pleamar (Moulis, 1994). Las hembras pueden emerger durante la estación varias veces, pero generalmente este evento sucede en el periodo de pleamar. Al estar en la playa lo primero que hacen es excavar un hoyo con las extremidades posteriores y

entonces forman una cavidad en forma de frasco de aproximadamente 15 a 25 cm de profundidad y 20-25 cm de diámetro (Mortimer y Pritchard, 2000) (Figura 4).

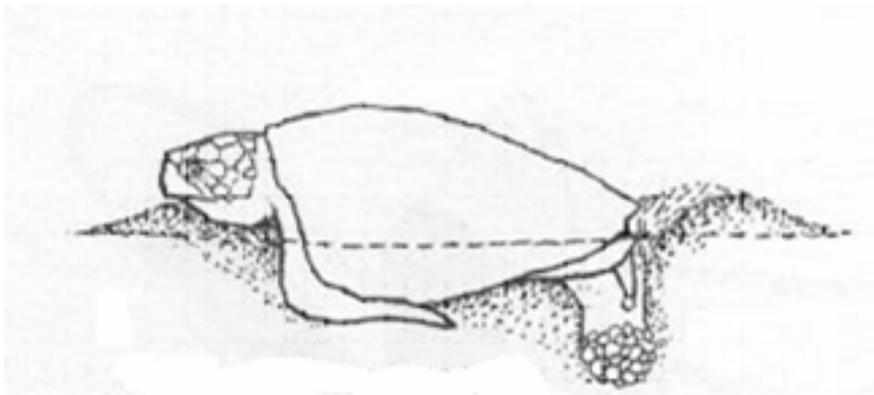


Figura 4. Cama excavada por una tortuga *Caretta caretta* a poca profundidad. (Mortimer y Pritchard, 2000).

Una hembra puede realizar ovoposiciones de una a siete veces durante una misma estación de puesta (Dodd, 1988), el intervalo entre cada una es de nueve a veintiocho días. Pueden existir grupos de hembras que anidan al mismo tiempo, aunque no todas lo hacen cada año. Cada puesta puede tener un promedio de 112 huevos, con un rango informado de 23 a 198. Los huevos son blancos y esféricos (34.7-55.2 mm) con cáscaras endurecidas. El periodo de la incubación tiene una duración de 46 a 80 días, lo cual depende de la temperatura de la incubación (Dodd, 1988).

En los huevos de *Caretta caretta* incubados a 32°C o más se desarrollan hembras mientras que los incubados a 28°C o menos se obtienen machos; en un rango de temperatura intermedio se pueden obtener los dos sexos, ha esta temperatura ideal se le denomina pivotal (Yntema y Mrosovsky, 1982). Los neonatos eclosionan generalmente en la noche, y su emergencia parece estar orientado por las bajas temperaturas de la arena superficial. El caparazón tiene una forma acorazonada y un color amarillo oscuro o negro grisáceos, que pueden medir de 33.5 a 55.0 mm (Van Buskirk y Crowder, 1994) y presentan tres quillas longitudinales. El plástron también lleva varias arrugas longitudinales (Figura 5).



Figura 5. Neonatos de *Caretta caretta* de la misma nidada con diferentes coloraciones (Foto: Ellie Anne López Barrera, 2003)

ANEXO 2



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
LABORATORIO CLINICO

23/09/04

N° Registro: 16922 Hx Cx:	Nombre Paciente: SIMONA	Sexo:	
Especie: SILVESTRE	Raza: TORTUGA	Edad: 3 AÑOS	Clase Servicio: EXTERNO
Proced: SANTA MARTA	Propietario: ELLIE ANNE LOPEZ	T. Muestra: SANGRE	
# Muestras: 1 Examen Realizado: HEMATOLOGIA	Dx NO REPORTADO		

Resultado:	Hcto %: 32	Basofilos %: 2
	Hb g/dl: 9.9	Eosinofilos %: 6
	RGR ccl x µl: 195000	Juveniles %: 0
	RGB ccl x µl: 1772	Otros %: 0
	Neutrofilos %: 60	PPT g/dl: 2.8
	Linfocitos %: 32	Fibrinogeno mg/dl: 100
	Monocitos %: 0	Plaquetas ccl x µl: NR
	Bandas %: 0	

Observaciones 04LC3461

Firma:

Resultado Únicamente Válido para la presente muestra



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA

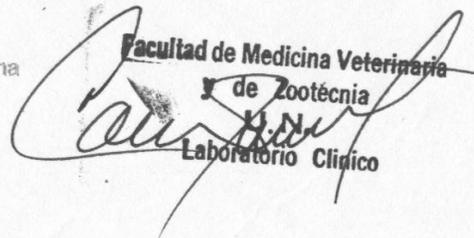
LABORATORIO CLINICO

FECHA: 19 de Agosto/2004 Reg No: 04LC2980 SOLICITADO POR: Ellie Anne Lopez
ESPECIE: Caretta caretta PROCEDENCIA: Santa Marta SEXO: EDAD 11 meses

HEMATOLOGIA

Reg	Hematocrito (%)	G. Blancos (cel/ μ l)	Heterofilos %	Linfocitos %	Monocitos %	Basofilos %	Eosinofilos %	PPT g/dl
10	25	3108	37	54	5	1	3	2
1	25	4218	41	57	2	0	0	2.4
8	23	5217	58	40	1	0	1	2
9	30	2886	52	37	3	0	8	2.2
7	26	2442	48	48	2	0	2	2
11	30	2886	37	58	2	1	2	2.2
6	26	3663	46	50	4	0	0	2
CN	24	3552	37	56	2	0	6	2.4
CZ	20	1887	46	36	6	0	12	2
59	25	1221	36	64	0	0	0	2
4CG	24	2664	40	56	2	0	2	2.4

Firma


Facultad de Medicina Veterinaria
y de Zootecnia
Laboratorio Clínico



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
LABORATORIO CLINICO

23/09/04

N° Registro: 16921 Hx Cx:	Nombre Paciente: JANIA	Sexo:	
Especie: SILVESTRE	Raza: TORTUGA	Edad: 3 AÑOS	Clase Servicio: EXTERNO
Proced: SANTA MARTA	Propietario: ELLIE ANNE LOPEZ	T. Muestra: SANGRE	
# Muestras: 1 Examen Realizado: HEMATOLOGIA	Dx NO REPORTADO		

Resultado: Hcto %: 32 Basofilos %: 1
Hb g/dl: 9.6 Eosinofilos %: 3
RGR ccl x µl : 3250000 Juveniles %: 0
RGB ccl x µl: 2661 Otros %: 0
Neutrofilos %: 65 PPT g/dl: 2.8
Linfocitos %: 31 Fibrinogeno mg/dl: 100
Monocitos %: 0 Plaquetas ccl x µl: NR
Bandas %: 0

Observaciones 04LC3460

Firma: 

Resultado Únicamente Válido para la presente muestra

ANEXO 3

1. Componentes del Medio TC 199

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	Molarity (mM)
Amino Acids			
Glycine	75	50	0.667
L-Alanine	89	25	0.281
L-Arginine hydrochloride	211	70	0.332
L-Aspartic acid	133	30	0.226
L-Cysteine hydrochloride-H ₂ O	176	0.1	0.000568
L-Cystine 2HCl	240	26	0.108
L-Glutamic Acid	147	75	0.510
L-Glutamine	146	100	0.685
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	210	21.88	0.104
L-Hydroxyproline	131	10	0.0763
L-Isoleucine	131	40	0.305
L-Leucine	131	60	0.458
L-Lysine hydrochloride	183	70	0.383
L-Methionine	149	15	0.101
L-Phenylalanine	165	25	0.152
L-Proline	115	40	0.348
L-Serine	105	25	0.238
L-Threonine	119	30	0.252
L-Tryptophan	204	10	0.0490
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	181	58	0.320
L-Valine	117	25	0.214
Vitamins			
Alpha-tocopherol Phosphate	702	0.01	0.0000142
Ascorbic Acid	176	0.05	0.000284
Biotin	244	0.01	0.0000410
Choline chloride	140	0.5	0.00357

D-Calcium pantothenate	477	0.01	0.0000210
Folic Acid	441	0.01	0.0000227
i-Inositol	180	0.05	0.000278
Menadione (Vitamin K3)	172	0.01	0.0000581
Niacinamide	122	0.025	0.000205
Nicotinic acid (Niacin)	123	0.025	0.000203
Para-Aminobenzoic Acid	137	0.05	0.000365
Pyridoxal hydrochloride	204	0.025	0.000123
Pyridoxine hydrochloride	206	0.025	0.000121
Riboflavin	376	0.01	0.0000266
Thiamine hydrochloride	337	0.01	0.0000297
Vitamin A (acetate)	328	0.1	0.000305
Vitamin D2 (Calciferol)	397	0.1	0.000252
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111	200	1.80
Ferric nitrate (Fe(NO ₃)-9H ₂ O)	404	0.7	0.00173
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120	97.67	0.814
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.33
Sodium Chloride (NaCl)	58	6800	117.24
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	138	140	1.01
Other Components			
Adenine sulfate	404	10	0.0248
Adenosine 5'-phosphate	347	0.2	0.000576
Adenosine 5'-triphosphate	605	1	0.00165
Colesterol	387	0.2	0.000517
D-Glucose (Dextrose)	180	1000	5.56
Deoxyribose	134	0.5	0.00373
Glutathione (reduced)	307	0.05	0.000163
Guanine hydrochloride	188	0.3	0.00160
Hypoxanthine Na	136	0.4	0.00294
Phenol Red	376.4	20	0.0531
Ribose	150	0.5	0.00333

Sodium Acetate	82	50	0.610
Thymine	126	0.3	0.00238
Tween 80®		20	
Uracil	112	0.3	0.00268
Xanthine-Na	152	0.3	0.00197

2. Componentes del medio RPMI 16 40

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	Molarity (mM)
Amino Acids			
Glycine	75	10	0.133
L-Arginine	174	200	1.15
L-Asparagine	132	50	0.379
L-Aspartic acid	133	20	0.150
L-Cystine 2HCl	313	65	0.208
L-Glutamic Acid	147	20	0.136
L-Glutamine	146	300	2.05
L-Histidine	155	15	0.0968
L-Hydroxyproline	131	20	0.153
L-Isoleucine	131	50	0.382
L-Leucine	131	50	0.382
L-Lysine hydrochloride	146	40	0.274
L-Methionine	149	15	0.101
L-Phenylalanine	165	15	0.0909
L-Proline	115	20	0.174
L-Serine	105	30	0.286
L-Threonine	119	20	0.168
L-Tryptophan	204	5	0.0245
L-Tyrosine disodium salt dehydrate	261	29	0.111
L-Valine	117	20	0.171
Vitamins			

Biotin	244	0.2	0.000820
Choline chloride	140	3	0.0214
D-Calcium pantothenate	477	0.25	0.000524
Folic Acid	441	1	0.00227
i-Inositol	180	35	0.194
Niacinamide	122	1	0.00820
Para-Aminobenzoic Acid	137	1	0.00730
Pyridoxine hydrochloride	206	1	0.00485
Riboflavin	376	0.2	0.000532
Thiamine hydrochloride	337	1	0.00297
Vitamin B12	1355	0.005	0.0000037
Inorganic Salts			
Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236	100	0.424
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120	48.84	0.407
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.33
Sodium Chloride (NaCl)	58	6000	103.45
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄) anhydrous	142	800	5.63
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180	2000	11.11
Glutathione (reduced)	307	1	0.00326
Phenol Red	376.4	5	0.0133