



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN**

TOLERANCIA TÉRMICA DE EMBRIONES DE LA TORTUGA GOLFINA, *LEPIDOCHELYS OLIVACEA*, EN DIFERENTES FASES DE SU DESARROLLO EMBRIONARIO.

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)**

PRESENTA:

BIÓL. JULIETA ALVAREZ SERVÍN

TUTOR

**DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM**

COMITÉ TUTORAL

**DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. ALEJANDRA GARCÍA GASCA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MAZATLÁN, SINALOA.

OCTUBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Unidad Académica Mazatlán) donde he adquirido el conocimiento en diferentes líneas de investigación para mi formación académica y que estoy dispuesta a compartir con personas que me rodeen en mi ámbito laboral.

Al Dr. Alberto Abreu por su incondicional apoyo para dirigir esta tesis, así como los conocimientos y enseñanzas compartidas durante mi formación académica.

A la Dra. Mayte Mascaró por enseñarme a comprender el uso de los paquetes estadísticos en el ambiente R y su valiosa asesoría para los análisis estadísticos de esta tesis.

A Ma. de los Ángeles Herrera por el apoyo con el trabajo en el laboratorio y el gran cariño que me brindó.

Al santuario de anidación “El Verde Camacho” y al Biól. Daniel Ríos y su equipo técnico por la atención brindada, sus instalaciones y el apoyo para la colecta de los nidos.

A mis compañeras de laboratorio: Miriam, Yazmin y Andrea por la ayuda que me brindaron durante mis experimentos y sus cuidados a las pequeñas tortuguitas, así como la amistad que compartimos.

A mis amigas, “chidlas”, por ser siempre las mejores y estar conmigo en momentos buenos y malos, además que fungieron como parte de mi familia en el bello Mazatlán.

A la Universidad Autónoma de México por darme la preparación como Maestra en Ciencias y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el período de la Maestría.

A cada uno de los miembros de mi Jurado: Dra. Alejandra García Gasca, Dr. Horacio Merchant Larios, Dra. Verónica Díaz Hernández y al Dr. Fausto Méndez de la Cruz por su tiempo y disposición para revisar, dar comentarios y críticas constructivas que mejoraron este trabajo.

A toda mi familia y amigos que siempre creyeron en mí para poder llegar al final de esta etapa. A mi mamá, mi papá y mi hermano que los amo y que me dieron su apoyo y cariño incondicional aun estando lejos de casa.

A una persona muy especial en mi vida, que siempre estuvo apoyándome y desvelándose junto a mí, por confiar en mí para llegar a este momento, por ser el amor de mi vida: Josué.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Importancia de la temperatura	1
1.2. Sistema circulatorio de reptiles	3
1.3. Desarrollo del corazón durante el período embrionario de las tortugas	8
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Estudios sobre impactos de temperatura.....	17
2.2. Ciclos circadianos en ritmo cardíaco en otros reptiles	20
3. ESPECIE DE ESTUDIO.....	21
3.1. Anatomía	21
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	23
6. HIPOTESIS	24
7. OBJETIVOS.....	24
7.1. General.....	24
7.2. Particulares	24
8. AREA DE ESTUDIO	25
9. MATERIALES Y MÉTODOS	26
9.1. Metodología general.....	26
9.1.1. Incubación	27
9.1.2. Observaciones no invasivas de los embriones	31
9.1.3. Seguimiento del desarrollo embrionario de tortuga golfina.....	33
9.1.4. Desarrollo y crecimiento	35
9.1.5. Fases del desarrollo muestreadas	35
9.2. Metodología de los objetivos particulares	36

9.2.1.	Comparar el efecto de diferentes nidos y dos temperaturas (28° y 32°C) sobre la tasa de crecimiento de embriones.	36
9.2.2.	Analizar el ritmo cardíaco de los embriones durante 24 hrs para determinar si existe (a) un ciclo circadiano o (b) sincronización entre embriones del mismo nido o entre nidos.	39
9.2.3.	Comparar los patrones del ritmo cardíaco y el límite mortal superior de temperatura en embriones de diferentes nidos y en diferentes etapas de desarrollo expuestos a incrementos de temperatura.....	39
9.2.4.	Análisis estadístico	45
10.	RESULTADOS.....	47
10.1.	Validación del ovoscopio para detectar rasgos morfológicos de referencia en el embrión	47
10.2.	Aproximación de las etapas del desarrollo cardíaco en tortuga golfinia.....	54
10.3.	Efecto de diferentes nidos y dos temperaturas (28° y 32°C) sobre la tasa de crecimiento de embriones.....	58
10.3.1.	Análisis del crecimiento embrionario.....	58
10.3.2.	Tasa de crecimiento embrionario: masa	58
10.4.	Ritmo cardíaco de los embriones durante 24 hrs para determinar si existe (a) un ciclo circadiano y (b) sincronización entre embriones del mismo nido o entre nidos.	61
10.4.1.	Ritmo cardíaco por huevo.....	62
10.4.2.	Ritmo cardíaco por nido.....	64
10.4.3.	Influencia de la temperatura	64
10.5.	Patrones del ritmo cardíaco y el límite mortal superior de temperatura en embriones de diferentes nidos y en diferentes etapas de desarrollo expuestos a incrementos de temperatura.....	67
10.5.1.	Detalles de embriones muestreados.....	67
10.5.2.	Seguimiento de los experimentos: temperatura	69
10.5.3.	Seguimiento de los experimentos: condición de embriones al finalizar estrés	75
10.5.4.	Seguimiento de los experimentos: mortalidad de embriones experimentales	79
10.5.5.	Seguimiento de los experimentos: pérdida de humedad.....	81
10.5.6.	Ajuste a los valores de temperatura registrados	82
10.5.7.	Modificaciones en el protocolo para el segundo experimento de estrés térmico (agosto 2016).....	84

10.6.	Análisis estadístico	85
10.6.1.	Fase lineal de la respuesta al estrés térmico	86
10.6.2.	Análisis de la respuesta completa en el ritmo cardíaco.....	100
10.7.	Comparación de nuestros resultados para tortuga golfina contra los de un reptil terrestre	112
11.	DISCUSIÓN.....	113
11.1.	Valoración del ovoscopio para monitoreo del desarrollo embrionario en tortuga marina.	113
11.2.	Efecto de nido de origen y temperatura de incubación sobre el crecimiento de embriones de tortuga golfina	115
11.3.	Efecto de ciclo circadiano sobre el ritmo cardíaco de embriones de tortuga golfina.	117
11.4.	Respuestas metabólicas en embriones a estrés térmico	118
11.4.1.	Contribuciones metodológicas.....	118
11.4.2.	Factores con efectos significativos	120
11.4.3.	Nueva perspectiva de límites de tolerancia térmica	122
11.4.4.	Relevancia de los resultados para la conservación.....	123
12.	CONCLUSIONES.....	125
13.	LITERATURA CITADA.....	127
14.	ANEXO.....	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El corazón de una tortuga adulta. Muestra la posición del corazón (A) y una vista ventral del corazón con sus tres cámaras (aurícula izquierda y derecha, un solo ventrículo) y un seno venoso (B y C). (Tomadas de http://slideplayer.com/slide/8416440/ , Wyneken & Witherington, 2001).	4
Figura 2. El corazón de un cocodrilo adulto. Abreviaturas: FP: foramen de Panizza, IS: septo interventricular, LA: atrio izquierdo, LAo: aorta izquierda, LAV: válvula izquierda atrioventricular, LV: ventrículo izquierdo, PF: foramen de la vena pulmonar, PulA: arteria pulmonar, RA: atrio derecho, RAo: aorta derecha, RAV: válvula derecha atrioventricular, RV: ventrículo derecho, SA: válvula sinoatrial (Tomado de Wyneken, 2009).	5
Figura 3. Diagrama de doble flujo sanguíneo en el corazón de reptiles no cocodrilianos. Las flechas rojas indican el flujo de sangre oxigenada, flechas azules la sangre desoxigenada y las flechas bicolor mezcla de los dos tipos de sangre (Tomado de Wyneken, 2009).	7
Figura 4. Modelos en 3D del corazón de <i>Emys orbicularis</i> de tres etapas de su desarrollo embrionario: etapa 8 (A), etapa 10 (B) y etapa 15 (C) mostrados en vista ventral, izquierda y dorsal. A=atrio o aurícula, AA=arco aórtico, ACV= vena cardinal anterior, LA=atrio izquierdo, OFT=tracto de salida, PCV=vena cardinal posterior, PV=vena pulmonar, RA=atrio derecho, V=ventrículo (Tomado de Bertens <i>et al.</i> , 2010).	11
Figura 5. Corte histológico del corazón de un embrión de <i>Emys orbicularis</i> en etapa 9 (A) y etapa 11 (B). A=atrio, CAVV=tejido del cojín formando la válvula atrioventricular, HSt=tallo del corazón, IHC=curva interna del corazón, LA=atrio izquierdo, MC=capa mesenquimal, OFT= tracto de salida, PC= cojines proximales, RA=atrio derecho, TC= trabéculas, V=ventrículo (Tomado de Bertens <i>et al.</i> , 2010).	13
Figura 6. Cortes histológicos del corazón de <i>Emys orbicularis</i> en etapa 14 (A-B), etapa 15 (B, C, D) y modelos en 3D de la vista del corazón en etapas 15-16 del desarrollo embrionario (E-F). AVC= canal atrioventricular, CA=cavidad arterial, CAVV=tejido del cojín formando la válvula atrioventricular, CP= cavidad pulmonar, CV=cavidad venosa, CVV=vena cardinal común, DC=cojines distales, HS=septo horizontal, LA=atrio izquierdo, OFT= tracto de salida, PC=cojines proximales, PM= músculo pectinado, PV=vena pulmonar, RA=atrio derecho, TC=trabéculas, V=ventrículo, VS=septo vertical. (Tomado de Bertens <i>et al.</i> , 2010).	14
Figura 7. Ubicación del sitio de colecta en el Santuario de Tortugas Marinas en la playa de El Verde Camacho, Sinaloa.	25

Figura 8. Fotografías de la distribución y configuración de las incubadoras dentro del cuarto de incubación.....	27
Figura 9. Diagrama de la incubadora y partes que la componen.....	29
Figura 10. Las dos modalidades de los sensores utilizados: A) sumergible de temperatura DS18B20 con recubrimiento de acero inoxidable. B) sin encapsulado de metal, conectado con soldadura y recubrimiento de thermo-fit para uso entre la Vermiculita.	30
Figura 11. Monitor <i>Buddy</i> Mk2 y sus partes componentes.	32
Figura 12. Dar inicio a una lectura en el monitor (izquierda) Girar el huevo 90° (derecha).	32
Figura 13. Diagrama del ovoscopio y sus partes que lo componen.....	33
Figura 14. Procedimiento aplicado a los huevos colectados previo a su incubación.	37
Figura 15. Distribución de embriones de tortuga golfina en los sistemas de incubación..	40
Figura 16. Calibración de conjunto de sensores de incubadoras experimentales. (A): La línea roja representa los valores de la temperatura de referencia medidos por el termómetro calibrado (T REF; las demás líneas son el conjunto de registros de los 11 sensores ocupados en las incubadoras. (B) Lecturas de sensores ajustados con factor de corrección junto con la temperatura de referencia (T REF).	41
Figura 17. Incubadora experimental "Reactor" con la plataforma para el sustrato y los huevos, además de los cables del calentador y sensores. Se programó para iniciar a 28° o 32°C y realizar incrementos graduales de temperatura a una tasa de 1.5°C/hr mediados por el sistema Arduino.	43
Figura 18. Incubadora "Buddy" con monitor de ritmo cardíaco, sincronizada para mantener temperaturas idénticas a las de la incubadora Reactor mediante el sistema Arduino (A); posición correcta del huevo sobre el monitor (B); frecuencia cardíaca registrada (C) y toma de temperatura superficial al huevo con termómetro IR (D).	43
Figura 19. Rasgos usados para seleccionar embriones para experimentación. Embrión con ojo pigmentado en 1er tercio, embrión con ojo y carapacho pigmentado en 2do tercio y embrión con cabeza, cuello y dorso pigmentados en 3er tercio del desarrollo.	44
Figura 20. Visualización de condición del embrión en huevos de tortuga golfina por medio del ovoscopio.....	47
Figura 21. Crecimiento embrionario con ganancia de peso respecto al tiempo de incubación.	58
Figura 22. Crecimiento embrionario en cuanto a longitud pico-cloaca respecto al tiempo de incubación.	59

Figura 23. Identificación de etapas durante el desarrollo embrionario respecto al tiempo de incubación.	60
Figura 24. Ritmo cardíaco (promedio de 4 lecturas en 4 minutos) de huevos (1-5) de 5 nidos (A-E) muestreados cada 6 horas durante un ciclo de 24 horas. Los nidos A y B también fueron muestreados a 6 y 2 hrs posterior al ciclo de 24h.	63
Figura 25. Ritmo cardíaco de huevos por NIDO en periodos de 6 y 2 horas.	64
Figura 26. Ritmo cardíaco a lo largo del muestreo.	65
Figura 27. Temperatura superficial de los huevos al inicio (A) y final (B) de cada muestreo a lo largo del ciclo de monitoreo.	66
Figura 28. Correlación entre ritmo cardíaco (LPM) y temperatura superficial del huevo al final de cada monitoreo.....	67
Figura 29. Embriones provenientes de la incubación a 32°C seleccionados para pruebas de estrés térmico en marzo: A) 2do tercio (ojo y caparazón pigmentados) y B) 3er tercio (cabeza, cuello y dorso pigmentados).....	68
Figura 30. Embriones provenientes de la incubación a 32°C seleccionados para pruebas de estrés térmico en agosto: A) 1er tercio (ojo pigmentado), B) 2do tercio (ojo y caparazón pigmentados) y C) 3er tercio (cabeza, cuello y dorso pigmentados).	69
Figura 31. Embriones provenientes de una incubación a 28°C seleccionados para pruebas experimentales de estrés térmico en agosto: A) 2do tercio (ojo y caparazón pigmentados) y C) 3er tercio cabeza, cuello y dorso pigmentados).	69
Figura 32. Registros del Arduino para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) en el monitor Buddy para embriones en 2do tercio de marzo.	70
Figura 33. Registros del Arduino para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés puntos azules) para embriones en 3er tercio de marzo.....	71
Figura 34. Registros del <i>Arduino</i> para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) en el monitor <i>Buddy</i> para embriones en 1er tercio de agosto.	72
Figura 35. Registros del <i>Arduino</i> para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) para embriones en 2do tercio de agosto.....	73

Figura 36. Registros del <i>Arduino</i> para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 28°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) para embriones en 2do tercio de agosto.	73
Figura 37. Registros del <i>Arduino</i> para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) para embriones en 3er tercio de agosto.	74
Figura 38. Registros del <i>Arduino</i> para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 28°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) para embriones en 3er tercio de agosto.	75
Figura 39. Observaciones por ovoscopía de los embriones en el segundo tercio del desarrollo sometidos a estrés térmico indicando muerte: embrión sin movilidad (izquierda) e inicio de la degradación del sistema vascular y mancha de sangre (derecha).	76
Figura 40. Embriones después de algunos días de su muerte: degradación total del sistema vascular y presencia de hongos (arriba), yema cocida y muerte definitiva del embrión (abajo).	77
Figura 41. Evidencias de señales de vida en embriones en periodo sexualmente diferenciado sometidos a calentamiento: pipping (izquierda) y eclosión (derecha).	77
Figura 42. Seguimiento de embriones experimentales: regreso de embriones a incubadora de origen (32°C) (A); embrión eclosionado durante la prueba térmica (B); embriones en pipping (C) y embrión muerto en prueba experimental (D).	78
Figura 43. Muerte embrionaria después de algunos días: degradación parcial del sistema vascular (A); presencia interna de hongos (B); muerte de embrión verificado por disección (C) relación de tamaño-vitelo (D).	79
Figura 44. Visualización de huevos inviábiles sin vascularización visible.	80
Figura 45. Registros de frecuencia cardíaca (LPM) de los embriones medidos con ayuda del monitor <i>Buddy</i>	81
Figura 46. Pérdida de humedad en embriones en PTS (izquierda) y SD (derecha).	82
Figura 47. Incubadora experimental con pelotas de ping-pong rellenas de agua con sal con un sensor dentro de cada pelota para el registro de temperatura interna.	83
Figura 48. Temperaturas registradas en sensores introducidos a pelotas de ping-pong (pelota 1 y 2) comparado con temperaturas medidas por IR (IR pelota p1 y p2) sobre la superficie de las pelotas y el seguimiento con sensores de la temperatura promedio en la incubadora (TempProm).	84

Figura 49. Curva idealizada del comportamiento del ritmo cardíaco en función de un aumento gradual de temperatura.	86
Figura 50. Regresiones para la fase lineal de la respuesta cardíaca de embriones de tortuga golfinia en tres diferentes etapas: 1er, 2do y 3er tercio en repeticiones y temperaturas de incubación diferentes (A= experimento de agosto para embriones incubados previamente a 32° C; B= agosto, a 28° C; C= marzo, a 32°C).	90
Figura 51. Comparación de valores de pendientes promedio entre tratamientos que indican un mayor incremento en la actividad cardíaca ante incrementos de temperatura entre menos desarrollado sea el embrión. 1er= primer tercio de la incubación, 2do= segundo tercio, 3er= tercer tercio; 28 y 32 = temperatura de la incubación previa; mar =experimento de marzo, ago= experimento de agosto.	91
Figura 52. Fase lineal del ritmo cardíaco (latidos por minuto) de embriones de tortuga golfinia en tres tercios del desarrollo (1er, 2do, 3er), dos repeticiones: A= marzo con tres nidos (A, B, C) y B= agosto con dos nidos (AA y BB) sometidos a calentamiento continuo a partir de dos temperaturas de incubación previa (28° o 32° C, columnas).	95
Figura 53. Correlación negativa entre biometrías de huevos (diámetros vs pesos) y coeficientes de las regresiones (pendiente: eje Y izquierdo e intersección: eje Y derecho) en función del peso de los huevos analizados para los dos nidos (AA y BB).	97
Figura 54. Relación entre los valores promedio por nido de peso de los huevos y la pendiente de regresión lineal de su tolerancia a incrementos de temperatura. Las barras de error representan los errores estándar para las dos medidas en cada uno de los nidos en segundo tercio del desarrollo embrionario en incubaciones de 32°C.	98
Figura 55. Regresiones lineales de las lecturas de ritmo cardíaco por huevo y por temperatura de incubación en los diferentes tercios muestreados en la repetición de agosto.	99
Figura 56. Cambios en ritmo cardíaco (latidos por minuto) de embriones de tortuga golfinia en tres tercios del desarrollo (1er, 2do, 3er) sometidos a calentamiento continuo a partir de la temperatura de incubación previa (28° o 32°C columnas).	103
Figura 57. Comparaciones de ritmo cardíaco entre las tres fases de desarrollo de embriones de tortuga golfinia correspondientes a dos nidos dentro de una misma temperatura (32°C).	106
Figura 58. Identificación de valores máximos de ritmo cardíaco. Valores de ritmo cardíaco (LPM) de embriones de tortuga golfinia incubados a dos temperaturas (32°C=columna izquierda; 28°C=columna derecha) en agosto. Valores máximos de LPM (línea punteada)	

en temperaturas entre 37-41°C y posteriormente caen bruscamente entre 43-46°C. Cada línea negra representa la trayectoria de la tasa cardíaca para un solo embrión. Las líneas rojas representan relaciones estimadas a partir del modelo general aditivo mixto con mejor ajuste. 109

Figura 59. Identificación de valores máximos de ritmo cardíaco. Valores de ritmo cardíaco (LPM) de embriones de tortuga golfina incubados a 32°C en marzo. Valores máximos de LPM (línea punteada) en temperaturas entre 40-41.5°C y posteriormente caen bruscamente entre 44-46°C. Cada línea negra representa la trayectoria de la tasa cardíaca para un solo embrión. Las líneas rojas representan relaciones estimadas a partir del modelo general aditivo mixto con mejor ajuste. 110

Figura 60. Patrón de ritmo cardíaco en embriones de lagartijas (línea amarilla) a lo largo del período de incubación de acuerdo con Angilletta *et al.*, (2013) comparado con patrón de ritmo cardíaco en diferentes tercios muestreados (1er, 2do, 3er) de embriones de tortuga marina provenientes de una incubación de 32°C. También se muestran las diferencias de coeficientes Q_{10} entre lagartijas y tortugas. 113

Figura 61. Diagrama del circuito electrónico del controlador de potencia (voltaje) de corriente alterna utilizado para el control de la temperatura en las incubadoras desarrolladas. 136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Correspondencia de las cuatro etapas críticas del desarrollo embrionario del corazón en la tortuga <i>Trachemys scripta</i> (Koshiba-Takeuchi <i>et al.</i> , 2009) con las etapas del desarrollo corporal en la especie (Greenbaum, 2002).....	10
Tabla 2. Desarrollo de corazón en tres etapas embrionarias clave de la tortuga <i>Emys orbicularis</i> (Bertens <i>et al.</i> , 2010) y la correspondencia en morfología corporal en <i>Chelydra serpentina</i> (Yntema, 1968).....	16
Tabla 3. Distribución de los sensores de temperatura dentro y fuera de las incubadoras.29	
Tabla 4. Periodos muestreados en dos temperaturas de incubación con su respectiva proporción y duración total de la incubación.	36
Tabla 5. Validación de ovoscopía para la identificación de etapas clave en el desarrollo embrionario en tortuga golfina.	50
Tabla 6. Correspondencia entre etapas del desarrollo embrionario en especies de tortugas dulceacuícolas y tortugas marinas.	55
Tabla 7. Etapas de desarrollo embrionario en tortugas marinas (Miller, 1985) análogas a las de Yntema (1968) para <i>Chelydra serpentina</i> , y las de Greenbaum (2002) para <i>Trachemys scripta</i>	56
Tabla 8. Correspondencias de las cuatro etapas del desarrollo cardíaco en embriones de tortugas extrapoladas para la especie en nuestro estudio sobre la base de las analogías en el desarrollo morfológico entre especies (ver capítulo 1.3).	57
Tabla 9. Periodos muestreados en dos temperaturas de incubación con su respectiva proporción y duración total de la incubación.	68
Tabla 10. Estadística inferencial para el modelo con mejor ajuste que explica la contribución de las variables.....	87
Tabla 11. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para etapas (1 vs 2 y 3) en Templnc (32°) en el experimento de agosto.....	88
Tabla 12. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para etapas (2 vs 3) en Templnc (32°) en el experimento de agosto.....	89
Tabla 13. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para etapas (2 vs 3) en Templnc (32°) en el experimento de marzo.	89
Tabla 14. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para etapas (2 vs 3) en Templnc (28°) en el experimento de agosto.....	89
Tabla 15. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (AA vs BB) en etapa (1er) en temperatura (32°) en el experimento de agosto.	92

Tabla 16. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (AA vs BB) en etapa (2do) en temperatura (32°) en el experimento de agosto.....	92
Tabla 17. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (AA vs BB) en etapa (3er) en temperatura (32°) en el experimento de agosto.	92
Tabla 18. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (AA vs BB) en etapa (2do) en temperatura (28°) en el experimento de agosto.....	92
Tabla 19. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (AA vs BB) en etapa (3er) en temperatura (28°) en el experimento de agosto.	93
Tabla 20. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (A vs B y C) en etapa (2do) en temperatura (32°) en el experimento de marzo.	93
Tabla 21. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (B vs C) en etapa (2do) en temperatura (32°) en el experimento de marzo.	93
Tabla 22. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (A vs B y C) en etapa (3er) en temperatura (32°) en el experimento de marzo.	93
Tabla 23. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (B vs C) en etapa (3er) en temperatura (32°) en el experimento de marzo.	94
Tabla 24. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para repeticiones (agosto vs marzo) en etapa (2do) en temperatura (32°).....	96
Tabla 25. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para repeticiones (agosto vs marzo) en etapa (3er) en temperatura (32°).....	96
Tabla 26. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para temperaturas de incubación (28° vs 32°) en etapa (2do) en el experimento de agosto.	96
Tabla 27. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para temperaturas de incubación (28° vs 32°) en etapa (3er) en el experimento de agosto.....	96
Tabla 28. Obtención del coeficiente de temperatura Q_{10} para comparar tasa metabólica entre tratamientos.....	100
Tabla 29. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales para el conjunto de datos de agosto y marzo.	101
Tabla 30. Modelo con mejor ajuste y sus estadísticas inferenciales para variables independientes del conjunto de datos de agosto.	102
Tabla 31. Modelo con mejor ajuste para interacción entre variables y sus estadísticas inferenciales del conjunto de datos de agosto.	103
Tabla 32. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales para el conjunto de datos de agosto a una temperatura de 32°C.	104

Tabla 33. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales con interacción entre Nido y Etapa del conjunto de datos de agosto a una temperatura de 32° C.....	105
Tabla 34. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales para el conjunto de datos de agosto de un tratamiento a 32°C anidando por nido.	106
Tabla 35. Modelo de buen ajuste y estadísticas inferenciales para la interacción entre la variable Nido y Pesolnc para el conjunto de datos de agosto.	107
Tabla 36. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales para el conjunto de datos de agosto y marzo.	107
Tabla 37. Resumen de valores para parámetros críticos: Los valores para la frecuencia cardíaca basal previo al inicio de incrementos en temperatura, las temperaturas máximas para valores máximos de ritmo cardíaco (TRCmax) y paro cardíaco (TPC) en embriones de tortuga golfina fueron derivados de los valores observados (rango) y el valor máximo del ajuste por regresión binomial usando la librería splines en el ambiente R.	111

RESUMEN

Los impactos más dramáticos del cambio climático en tortugas marinas ocurrirán muy probablemente en la etapa embrionaria por su estrecho rango de temperatura viable (24-34°C) y ausencia de cuidado parental. El principal objetivo de este trabajo fue monitorear las tasas cardíacas en embriones de tortuga golfina bajo estrés térmico agudo con el fin de analizar las respuestas fisiológicas ante dicho estrés e identificar tolerancias térmicas superiores para embriones de tortuga golfina provenientes de incubaciones a dos temperaturas constantes (28° y 32°C).

Una contribución del trabajo fue la validación de un ovoscopio casero para la observación no invasiva de embriones que permitió detectar viabilidad e identificar rasgos característicos de etapas de su desarrollo (1er, 2do y 3er tercio) mediante cambios de pigmentación en el cuerpo.

Para cuantificar la posible influencia de origen materno y temperatura sobre la tasa de crecimiento en fase embrionaria, se realizó un experimento preliminar sobre el crecimiento embrionario para huevos de dos distintas madres y a dos temperaturas de incubación (28° y 32°C). Se verificó un efecto de nido observando un patrón de mayor crecimiento para embriones de uno de los nidos (medido por incrementos de masa y longitud). Sin embargo, ambos nidos eclosionaron sincrónicamente al término.

Debido a que se ha reportado la existencia de ciclos circadianos que afectan el ritmo cardíaco en algunas tortugas (*Emydura macquarri*) y que la presencia de éstos en tortuga golfina podría confundir nuestras evaluaciones, se realizó un análisis preliminar y no se detectó dicho patrón circadiano.

Adaptando la metodología de Angilletta *et al.* (2013), se estimaron temperaturas letales para embriones de tortuga golfina por medio del ritmo cardíaco bajo condiciones de aumentos continuos de temperatura (1.5°C/h). Todos los embriones exhibieron un patrón similar con incrementos inmediatos en frecuencias cardíacas a partir de los valores basales (aproximadamente 90 y 109 LPM, para incubaciones de 28° y 32°C, respectivamente) hasta una temperatura máxima previa al paro cardíaco (TRCmax). Este patrón refleja una capacidad de responder fisiológicamente al estrés mediante un aumento de su tasa metabólica. El valor TRCmax fue considerado como indicativo de la temperatura letal. Ya que el desempeño cardíaco de embriones incubados a la mayor temperatura de incubación previa (32°C) fue mayor (TRCmax 37-41°C) sugiere que aumentos en la temperatura de incubación promueve una aclimatación térmica. No se detectó una influencia significativa por el nido de origen en las pruebas de tolerancia, sin embargo, las ligeras y consistentes

diferencias (pero no significativas) en el desempeño cardíaco entre nidos sugiere que podrían existir y para detectarlas será necesario usar un tamaño de muestra de huevos más grande.

El factor de mayor influencia sobre la tolerancia térmica de embriones fue la etapa de desarrollo. Consistentemente, los embriones en primer tercio de desarrollo exhibieron una respuesta más pronunciada al incrementar su tasa cardíaca bajo los aumentos de temperatura, así como una TRCmax más bajo (37°C) que los otros dos períodos.

Estos resultados revelan una capacidad poco conocida para embriones de tortuga marina para tolerar aumentos agudos de temperaturas que rebasan por mucho los umbrales letales previamente establecidos pero para condiciones de temperatura constante y durante el período completo de incubación. El nuevo enfoque resuelve vacíos en el conocimiento de la biología de la especie y ofrece una metodología para evaluar los impactos de fenómenos esporádicos de temperaturas extremas que ya se reportan en playas de anidación y que probablemente aumenten en frecuencia y duración conforme prosiga el calentamiento global.

ABSTRACT

The most dramatic impacts of climate change on sea turtles will most likely concentrate on the embryonic stage because of their narrow viable temperature range (24-34°C) and an absence of parental care. The main objective of this study was monitoring the cardiac rates of the Olive Ridley embryos under acute thermal stress in order to analyse the physiological responses and to identify the upper thermal tolerances for the turtle embryos previously incubated at two constant temperatures (28° and 32°C).

One of this study's contribution was the validation of a home-made candler for the non-invasive observation of embryos that allowed to detect viability and identify characteristic traits developmental stages (1st, 2nd and 3rd third) through changes in the patterns of body pigmentation.

To quantify the possible influence of maternal origin and incubation temperature on growth rates, change in size and weight was monitored for embryos from two different nests and at two incubation temperatures (28° and 32°C). Nest of origin had a very significant influence, as a higher growth rate for embryos from one of the nests was observed. Nonetheless, both nests hatched synchronously.

Because circadian cycles have been reported to affect the heart rate in some turtles (*Emydura macquarri*) and the occurrence of these in our species could confound our assessments, a preliminary analysis was performed and as no circadian patterns were detected this phenomenon was ruled out as a contributing factor.

Adapting the methods of Angilletta *et al.* (2013), lethal temperatures for Olive Ridley embryos were assessed from monitoring heart rate under conditions of continuous temperature increases (1.5°C/h). All embryos exhibited a similar pattern with immediate increases in heart rates from baseline (approximately 90 and 109 BPM, for incubations of 28° and 32°C, respectively) to a maximum pre-cardiac arrest (RCTmax) temperature. This pattern reflects an ability to respond physiologically to stress by increasing metabolic rate. The RCTmax value was considered as indicative of the lethal temperature. Since cardiac performance of embryos incubated at the higher incubation temperature (32°C) was higher (RCTmax 37-41°C) we conclude that higher incubation temperatures promote thermal acclimation. No significant influence was detected by the nest of origin in the tolerance assessments, however, the slight and consistent differences (but non-significant) in the cardiac performance between the two experimental nests suggests that they are present but because of the inherent variability a much larger sample of eggs will be needed.

The factor of greatest influence on the embryo thermal tolerance was developmental stage. Consistently, embryos in the first third of development exhibited a more pronounced increase in their heart rate with temperature increases, as well as a lower RCT_{max} (37°C) than the later two periods.

These results revealed a little known ability for sea turtle embryos to tolerate acute increases in temperatures that far exceeds the previously documented lethal thresholds. These viable limits are for constant temperature incubations lasting the entire incubation period. The new approach fills key knowledge gaps in the species' thermal limits under acute thermal stress that will be able to estimate the impacts of sporadic extreme temperatures that are already being reported from nesting beaches and are expected to increase in frequency and duration in a context of climate warming.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Importancia de la temperatura*

El fenómeno del cambio climático se considera como una de las principales amenazas sobre las especies para el próximo siglo, aunque ya en la actualidad se registran impactos tangibles por aumentos en la temperatura sobre la biodiversidad (Hamann *et al.*, 2013). A pesar de críticas iniciales sobre su veracidad, los análisis de la información disponible por el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC, por sus siglas en inglés) concluyó que el calentamiento del sistema climático es inequívoco (IPCC, 2007) y con repercusiones en múltiples estratos de los ambientes naturales. En el caso de especies ya mermadas y con mayores vulnerabilidades a parámetros ambientales las consecuencias pueden ser drásticas.

Por las características de historia de vida de las tortugas marinas, como una determinación sexual mediada por la temperatura de incubación, maduración sexual tardía, altamente migratorias y la necesidad imperante de contar con un rango de temperaturas viable en playas de anidación, estas especies serán probablemente afectadas por el calentamiento global. Todas las especies están consideradas en riesgo de extinción debido a largos períodos históricos en los que han estado sujetas a niveles insustentables de explotación. A pesar de logros importantes en la recuperación de especies y poblaciones gracias a programas de conservación aplicados a lo largo de varias décadas, existe preocupación por las alteraciones proyectadas en un escenario de cambio climático sobre hábitats críticos como aquellos usados para su reproducción, desarrollo o alimentación (Hawkes *et al.*, 2009; Poloczanska *et al.*, 2009).

El impacto por alteraciones al régimen térmico se agregará a las afectaciones ocasionadas por las actividades directas e indirectas del hombre que ya han mermado la resiliencia de las especies ante futuros estresores ambientales.

Si bien las tortugas marinas sobrevivieron cambios en las temperaturas del ambiente en épocas geológicas, la preocupación es que la actual velocidad de los cambios es mayor que la capacidad de respuesta de las tortugas marinas. Los cambios involucrarán modificaciones a múltiples factores ambientales de relevancia para estas especies (incremento en las temperaturas promedio del aire y del agua, incrementos en el nivel del mar, cambios en los patrones de precipitación y de los niveles de tormentas), que las afectarán en todas sus etapas de desarrollo y en diferentes escalas temporales y geográficas (Fuentes *et al.*, 2011; Hawkes *et al.*, 2009). Sin embargo; los impactos más

significativos ocurrirán sobre la fase reproductiva que se lleva a cabo en hábitats terrestres (anidación, incubación de los huevos, eclosión de los neonatos) debido a que existirán efectos contundentes ocasionados por incrementos en la temperatura del ambiente, incrementos en el nivel del mar y actividades ciclónicas que impactarán sobre la calidad del medio de la incubación en la etapa embrionaria y por ende su capacidad reproductiva (Fuentes & Abbs, 2010; Fuentes *et al.*, 2010a,b; Hawkes *et al.*, 2007; Witt *et al.*, 2010).

A pesar de que las tortugas marinas han sido ampliamente estudiadas en sus múltiples hábitats y diferentes etapas, persisten vacíos del conocimiento sobre las etapas embrionarias que es la etapa más vulnerable al calentamiento. Esta etapa ocurre en tierra firme, debido a que los huevos necesitan de intercambio gaseoso para su desarrollo y lograr una eclosión exitosa. Sin embargo; a diferencia de embriones de especies vivíparas (que podría movilizarse en condiciones ambientales adversas), o de aquellas que reciben cuidado parental (en las que uno o ambos padres cambian el sitio de incubación y desarrollo si las condiciones no son propicias) los embriones de tortugas marinas permanecen obligadamente en el sitio donde los deposita la madre y expuestos a la condición ambiental que persista durante la incubación. Las consecuencias son importantes porque variables ambientales, particularmente la temperatura, definen características de las crías resultantes que afecten su capacidad para sobrevivir las primeras etapas cruciales de vida. Por ejemplo, se ha demostrado que incrementos en la temperatura ambiental en los hábitats de reproducción de las tortugas marinas se reflejan en cambios fenológicos en el periodo de anidación de las tortugas, alteraciones en la proporción natural de sexos ya que la temperatura determina el sexo de los neonatos, así como una reducción en la tasa de eclosión de las crías (Jourdan & Fuentes, 2015).

El embrión en desarrollo es capaz de eclosionar solamente si la incubación se lleva a cabo dentro de un intervalo relativamente estrecho de temperaturas (24 a 33-35°C; Miller, 1985; Ackerman, 1997). Altas temperaturas de incubación pueden también inhibir el desarrollo embrionario, ocasionando anomalías fenotípicas o muerte (Citas de Howard *et al.*, 2014: (Packard & Packard, 1988; Du & Ji, 2003; Maulany *et al.*, 2012a; Telemeco *et al.*, 2013; Pike 2014). Aumentos en la temperatura dentro del nido reduce los niveles de oxígeno y entorpece la coordinación muscular de la cría, obstaculizando la capacidad para salir a la superficie, desplazarse por la playa e ingresar al mar. Temperaturas en el extremo alto de los límites que aun permiten la eclosión pueden dar lugar a crías más pequeñas, una reducción en su habilidad locomotora lo que, potencialmente, aumentaría la susceptibilidad a la depredación de las crías en su camino al mar (Ischer *et al.*, 2009; Segura

& Cajade, 2010; Booth & Evans 2011; Maulany *et al.*, 2012b; Booth *et al.*, 2013; Read *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2014).

Estudios en campo y laboratorio en tortugas marinas, han contribuido información útil para comprender la relación entre el éxito de eclosión de embriones y la temperatura de incubación. En estos resultados se han manifestado diferencias para los umbrales mortales entre y dentro de poblaciones, dependiendo por lo menos parcialmente de la especie, localidad, y profundidad de las nidadas (Howard *et al.*, 2014) indicando la necesidad de profundizar en la investigación sobre los factores específicos que definen estas diferencias. Adicionalmente a probables diferencias intrínsecas entre especies en su tolerancia a estrés térmico, también podría existir niveles de diversidad intra-poblacional definidas por diferencias genéticas o nutricionales entre madres que se reflejarán en la calidad de su progenie. Poco se ha trabajado sistemáticamente en este aspecto.

En otros reptiles, la literatura en aspectos de la fisiología de procesos embrionarios relacionados con la respuesta a estrés térmico es mucho más extensa y en la última década se han aprovechado para comenzar a desarrollar modelos predictivos sobre el impacto del cambio climático sobre especies de reptiles (p. ej. Angilletta *et al.*, 2013) debido a las limitaciones en el uso de especies de tortugas marinas como modelos experimentales al ser especies protegidas en la mayoría de los países.

1.2. Sistema circulatorio de reptiles

El sistema circulatorio de los reptiles consta de un conjunto de arterias que transportan sangre oxigenada a través del cuerpo, venas que devuelven la sangre desoxigenada al corazón y vesículas linfáticas, así como un corazón y un seno venoso, (Mitchell, 2009). El corazón en las tortugas se sitúa en la línea media ventral donde se cruzan los escudos humeral, pectoral y abdominal del plastrón (Kik & Mitchell, 2005) y se delimita dentro del pericardio. Dorsalmente se encuentra rodeado por los pulmones y lateralmente por los lóbulos del hígado (Mitchell, 2009) (Figura 1). En las lagartijas, serpientes y tortugas el corazón está conformado por tres cámaras (dos aurículas y un ventrículo) mientras que el de los cocodrilos hay cuatro (dos aurículas y dos ventrículos) (Figura 2). Adicionalmente existe un seno venoso en todos los reptiles, considerada un cuarto componente del corazón (Wyneken, 2009), que recibe sangre venosa proveniente de la cabeza, las extremidades y el cuerpo para conducirla al atrio derecho (Wyneken & Witherington, 2001; Kik & Mitchell, 2005).

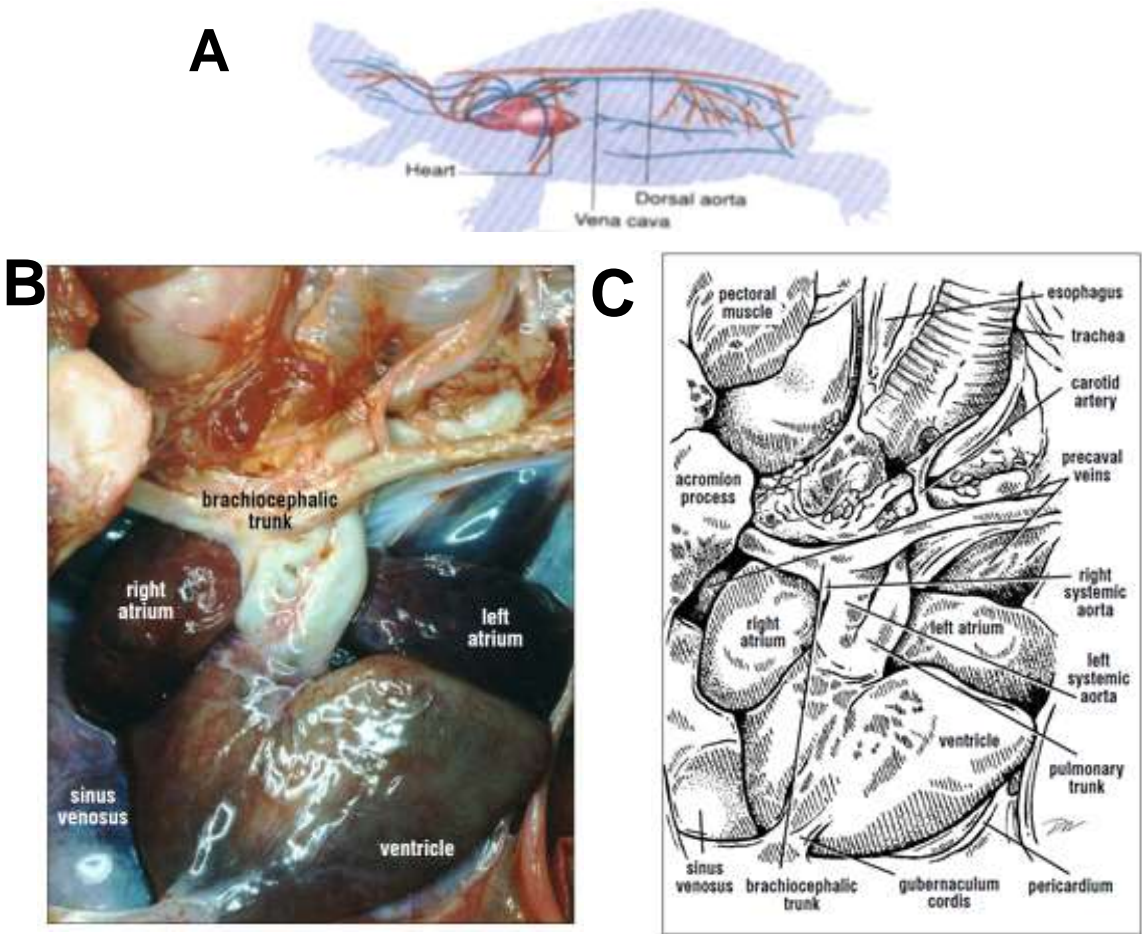


Figura 1. El corazón de una tortuga adulta. Muestra la posición del corazón (A) y una vista ventral del corazón con sus tres cámaras (aurícula izquierda y derecha, un solo ventrículo) y un seno venoso (B y C). (Tomadas de <http://slideplayer.com/slide/8416440/>, Wyneken & Witherington, 2001).

En el corazón de los cocodrilos existe un tabique o septo interventricular completo (Figura 2), el cual divide los dos ventrículos y evita la mezcla de sangre oxigenada y desoxigenada. En los demás reptiles existe un cierto grado de mezcla debido a que el septo del ventrículo es incompleto y se presenta en forma de apenas un puente muscular que se origina de la pared ventricular ventral (Hicks, 2002) (Figura 2).

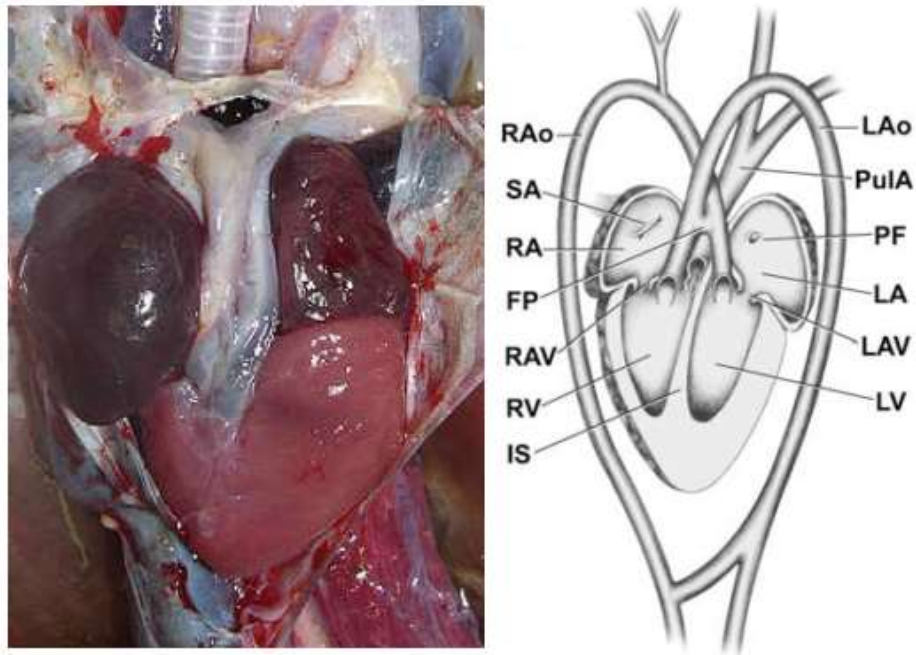


Figura 2. El corazón de un cocodrilo adulto. Abreviaturas: FP: foramen de Panizza, IS: septo interventricular, LA: atrio izquierdo, LAo: aorta izquierda, LAV: válvula izquierda atrioventricular, LV: ventrículo izquierdo, PF: foramen de la vena pulmonar, PulA: arteria pulmonar, RA: atrio derecho, RAo: aorta derecha, RAV: válvula derecha atrioventricular, RV: ventrículo derecho, SA: válvula sinoatrial (Tomado de Wyneken, 2009).

Este es el caso del corazón de las tortugas donde se observan dos atrios bien formados de pared delgada y cubiertos por músculos pectinados (Bertens *et al.*, 2010). Además, dentro del ventrículo hay 3 cavidades: la cavidad venosa y la cavidad arterial que están separados por un septo vertical y la cavidad pulmonar que se separa por el septo horizontal. Las válvulas atrioventriculares son estructuras bicúspides y membranosas. Los arcos aórticos izquierdo y derecho se unen para formar una única aorta (Figura 1). Existen algunas similitudes en la anatomía del corazón que comparten con aves y mamíferos durante el proceso de organogénesis como el desarrollo del bucle cardíaco, trabéculas ventriculares, la formación de la curvatura interna del corazón y la presencia de un par de cojines endocárdicos auriculoventriculares que dan lugar a la formación de las válvulas atrioventriculares (Bertens *et al.*, 2010).

El sistema circulatorio de reptiles, aves y mamíferos consiste en un flujo sanguíneo de circulación doble. Es decir, la sangre pasa dos veces por el corazón, una como sangre venosa o desoxigenada y otra como sangre arterial u oxigenada. Sin embargo, el circuito de la circulación difiere dependiendo del número de cavidades en el corazón.

El sistema de los reptiles no cocodrilianos posee una circulación doble pero además incompleta. Esto debido a que como la división del ventrículo es solamente parcial, se genera cierto grado de mezcla entre sangre venosa y arterial lo que afecta la eficacia del corazón (Figura 3). Por el contrario, los cocodrilos, mamíferos y aves poseen un sistema circulatorio doble pero completo, en donde no hay mezcla de sangre venosa con arterial y, por tanto, es más eficaz.

La circulación de la sangre en tortugas comienza en las venas precava, postcava y hepáticas que drenan hacia el seno venoso (Figura 2) que es una cavidad muscular localizada en la superficie dorsal de la aurícula derecha. Durante el proceso de diástole auricular la sangre se dirige del seno venoso hacia la aurícula derecha. En contraste, durante la sístole auricular la sangre es dirigida hacia la cavidad venosa del ventrículo (Kik & Mitchell, 2005) (Figura 3). Los atrios del corazón de la tortuga suministran sangre al ventrículo y, simultáneamente, el atrio derecho suministra sangre oxigenada a la cavidad venosa. Mientras, la sangre desoxigenada penetra en la cavidad arterial proveniente del atrio izquierdo. Durante el movimiento de sístole ventricular la sangre puede salir a la circulación desde la cavidad pulmonar y de aquí la sangre es dirigida a la arteria pulmonar y luego a los pulmones o bien desde la cavidad venosa hasta el tronco aórtico (Wyneken, 2009) (Figura 3).

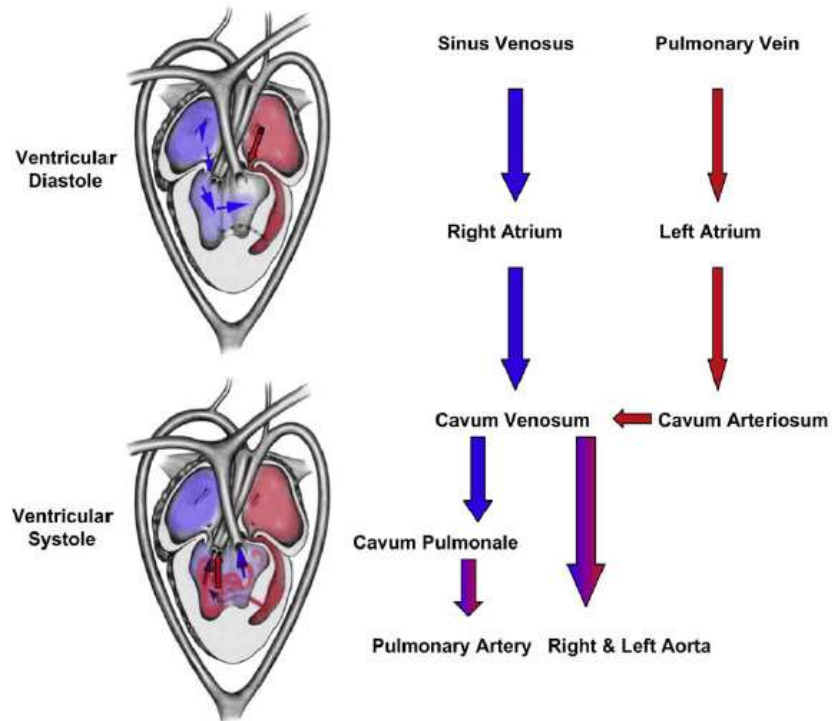


Figura 3. Diagrama de doble flujo sanguíneo en el corazón de reptiles no cocodrilianos. Las flechas rojas indican el flujo de sangre oxigenada, flechas azules la sangre desoxigenada y las flechas bicolor mezcla de los dos tipos de sangre (Tomado de Wyneken, 2009).

Antiguamente se consideraba el corazón de las tortugas como un órgano primitivo, en una etapa de transición entre el sistema circulatorio de peces y el doble sistema circulatorio de peces pulmonados y tetrápodos (incluyendo aves y mamíferos). Además, que era un sistema ineficiente e inacabado comparado con el sistema casi perfecto de especies más evolucionadas. En la segunda mitad del siglo XX esta visión fue rechazada y el concepto moderno es que el corazón de las tortugas es un órgano altamente especializado y la mezcla de sangre dentro del ventrículo está regulada y varía con procesos fisiológicos adaptados a su ecología particular. Por ejemplo, la tortuga laúd (*Dermodochelys coriacea*) posee un puente muscular bien desarrollado y esfínteres musculares que controlan el flujo a las arterias pulmonares de manera eficaz (Wyneken, 2009) que representan adaptaciones para el intercambio gaseoso asociado a permanecer largos periodos de tiempo debajo del agua.

1.3. Desarrollo del corazón durante el período embrionario de las tortugas

El nivel de desarrollo del corazón a lo largo de la embriogénesis tendrá un efecto sobre su capacidad para enfrentar cambios ambientales durante esta etapa crítica. Por ejemplo, durante las primeras etapas de desarrollo el corazón en tortugas aun no contiene las diferentes cámaras y su capacidad para bombeo es mucho menor a la que logra una vez que completa la construcción de las distintas cavidades propias del órgano maduro.

El conocer las etapas de desarrollo cardíaco permitirá una mejor interpretación de las respuestas de los embriones a condiciones adversas en la incubación. Sin embargo, en tortugas marinas persisten muchos vacíos de conocimiento sobre el desarrollo del corazón por lo cual es necesario acudir a resultados con otras especies de tortugas y suponer un proceso comparable extrapolando de lo que se conoce de tortugas semiacuáticas o terrestres que pertenecen al mismo Orden. Aun así, la correspondencia se complica adicionalmente porque las descripciones del desarrollo cardíaco son asociadas a las diferentes etapas del crecimiento embrionario de la especie objeto del estudio con nomenclaturas que varían entre autores trabajando con distintas especies y que podrían presentar procesos diversos. No obstante, en ausencia de observaciones directas sobre la especie de interés, las correspondencias que se han logrado para las distintas etapas de diversas especies de tortugas usadas por los autores son aceptables y útiles para aproximar el conocimiento del desarrollo cardíaco entre especies.

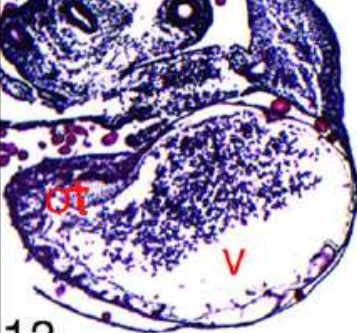

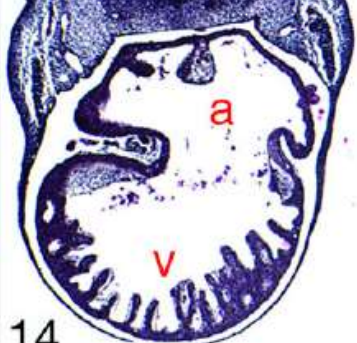


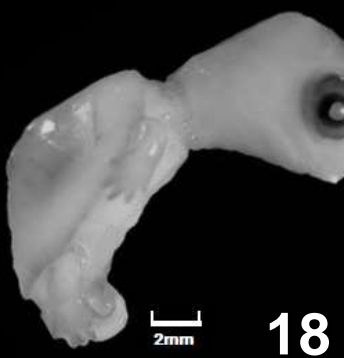

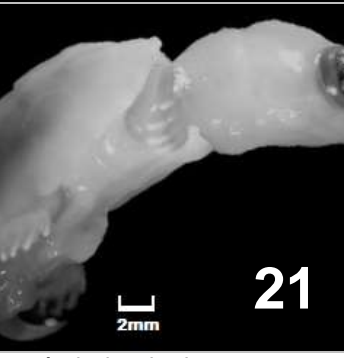
Uno de los pocos estudios sobre desarrollo del corazón en tortugas es el de Koshiba-Takeuchi *et al.* (2009) quienes describen y comparan el proceso en varias especies incluyendo la tortuga *Trachemys scripta*. Presentan cortes histológicos que identifican las cuatro principales etapas del desarrollo, desde el corazón con diferenciación incipiente hasta el corazón maduro con las cavidades finales: (1) desarrollo incipiente en un tubo por donde corre una vena vitelina que posteriormente dará lugar a un corazón sin septación (etapa 12); (2) inicia la septación cardíaca que dividirá al corazón en dos cavidades principales, una aurícula y un ventrículo (etapa 14); (3) ha ocurrido la septación cardíaca, es decir se separa la aurícula derecha de la izquierda (etapa 17) y por último (4) el desarrollo de un septo en el interior del ventrículo que lo dividirá parcialmente, ya se tiene un corazón con 3 cámaras bien desarrolladas (etapa 21). Como los autores asocian el proceso a las etapas de crecimiento embrionario de la especie es necesario asociar la evolución cardíaca con cambios en la morfología externa descrita en trabajos independientes como el de Greenbaum (2002) (Tabla 1).

La descripción más detallada del desarrollo del corazón en tortugas es la de Bertens *et al.* (2010) (Tabla 2) para embriones de la tortuga galápagos europeo, *Emys orbicularis* (especie semiacuática). Proporcionan información sobre estructuras y el proceso de organogénesis para el cual construyeron modelos en tercera dimensión con algunos estudios histológicos pero la nomenclatura por etapas de desarrollo que aplican son las de Yntema (1968) para la tortuga lagarto, *Chelydra serpentina* y que los autores dividen en 3 períodos: presomita (estadios 0-3), de somitas (estadios 4-10) y de extremidades (estadios 11-26) (Bertens *et al.*, 2010).

Según estos mismos autores, durante la **etapa 6** ya se encuentran 8 pares de somitas visibles y los tubos endocárdicos se fusionan para dar inicio a la formación del corazón a partir de un tubo cardíaco primitivo el cual se une al mesocardio dorsal. Conforme progresa la tubulación desaparecerá y quedará un material amorfo extracelular llamado gelatina cardíaca.

Para la **etapa 8** se observan 14 pares de somitas y el tubo cardíaco comienza a flexionarse dando lugar a un bucle cardíaco en forma de “S” (Figura 4A). En el extremo caudal de la curvatura del tubo posee un pliegue que formará el atrio primitivo (Figura 4A), dando lugar a la primera cavidad del corazón. A lo largo del tubo se encuentra el ventrículo primitivo y el tracto de salida (Figura 4B).

Tabla 1. Correspondencia de las cuatro etapas críticas del desarrollo embrionario del corazón en la tortuga *Trachemys scripta* (Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2009) con las etapas del desarrollo corporal en la especie (Greenbaum, 2002).

Desarrollo de corazón (<i>Trachemys scripta</i>)	Morfología de embriones	Rasgos sobresalientes
 <p>12</p>	 <p>12</p>	<p>Corazón: Desarrollo incipiente en un tubo donde corre la vena vitelina que dará lugar a las cavidades del corazón. Las válvulas se originarán en el tracto de salida (ot).</p> <p>Cuerpo: Protuberancia occipital es notablemente más alta que la frontal. Hendiduras faríngeas se hacen presentes. Una protuberancia genital entre las extremidades posteriores.</p>
 <p>14</p>	 <p>15</p>	<p>Corazón: Inicia la septación cardíaca para dividir al corazón en dos cavidades (una aurícula y un ventrículo).</p> <p>Cuerpo: Procesos nasales, maxilares y laterales fusionados. Hendiduras faríngeas cerradas. Eje de la extremidad anterior tiene una orientación caudal y está en etapa de padel.</p>
 <p>17</p>	 <p>18</p>	<p>Corazón: Se ha separado la aurícula derecha de la izquierda. Dentro del ventrículo trabéculas con expansión del tejido del miocardio que es el precursor del septo interventricular.</p> <p>Cuerpo: Costillas son visibles por debajo del caparazón. Ligeras marcas de los escudos marginales. Pliegue presente en los bordes de la protuberancia genital.</p>
 <p>21</p>	 <p>21</p>	<p>Corazón: Dentro del ventrículo comienza desarrollo de puente muscular o septo interventricular parcial. Corazón totalmente funcional con tres cámaras bien desarrolladas (dos aurículas y un solo ventrículo con septación incompleta).</p> <p>Cuerpo: Escamas en la superficie dorso lateral de la extremidad anterior evidentes. Abertura ventral se ha cerrado, ocultando la papila urogenital.</p>

*Abreviaturas: a=atrio, la=atrio izquierdo, lv=ventrículo izquierdo, ot=tracto de salida, ra=atrio derecho, rv=ventrículo derecho, v=ventrículo, flecha= septo interventricular incompleto. Los números indican la etapa del desarrollo según los autores.

Posteriormente, se vuelve a doblar poco a poco hasta provocar la separación del tracto de salida y la vena pulmonar del resto del ventrículo (Figura 4C), lo que da como resultado el desarrollo del septo horizontal, que es una membrana que separa la cavidad pulmonar de la cavidad venosa y arterial.

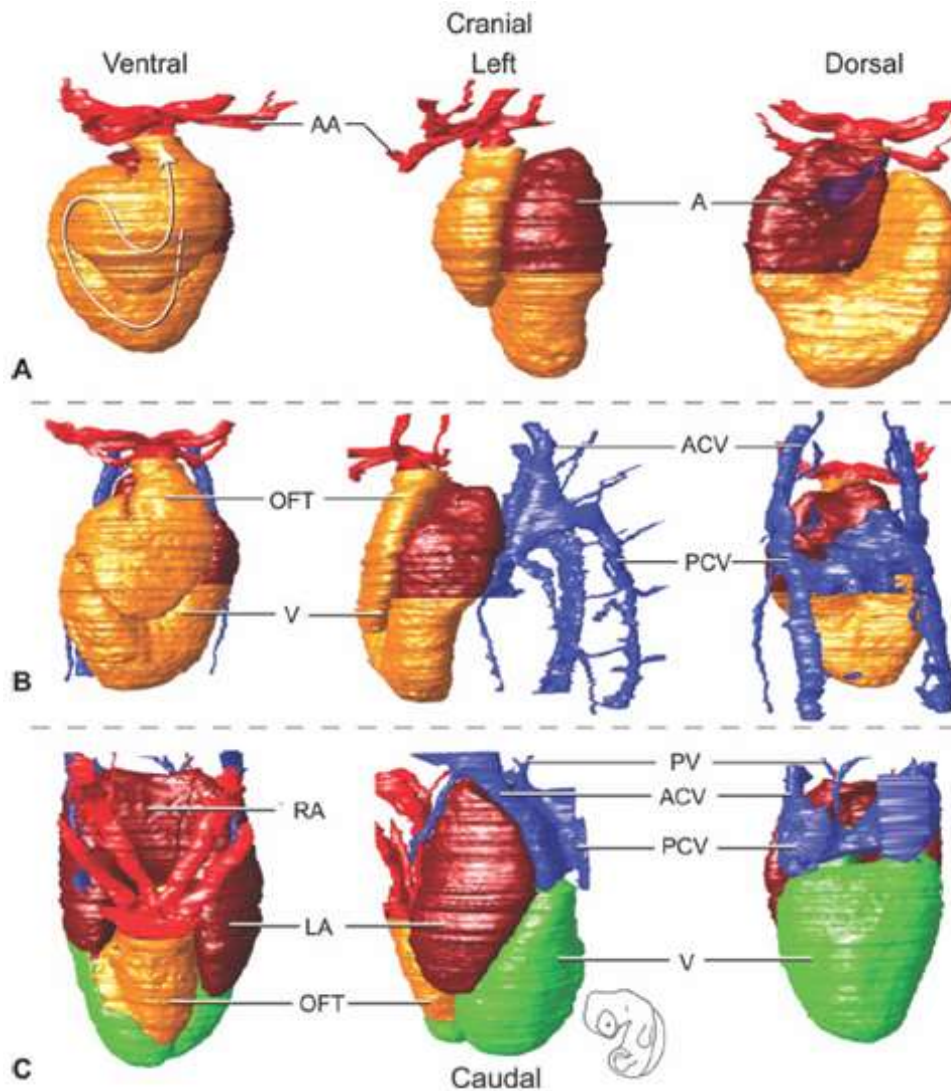


Figura 4. Modelos en 3D del corazón de *Emys orbicularis* de tres etapas de su desarrollo embrionario: **etapa 8** (A), **etapa 10** (B) y **etapa 15** (C) mostrados en vista ventral, izquierda y dorsal. A=atrio o aurícula, AA=arco aórtico, ACV= vena cardinal anterior, LA=atrio izquierdo, OFT=tracto de salida, PCV=vena cardinal posterior, PV=vena pulmonar, RA=atrio derecho, V=ventrículo (Tomado de Bertens *et al.*, 2010).

Una vez que se forma el asa, la gelatina cardíaca que se distribuye a lo largo del tubo cardíaco, modifica su aspecto y desarrolla células mesenquimáticas. Además, se acumula en algunas regiones y disminuye en otras para posteriormente ayudar a formar el tabique

interauricular que se nota como una cresta engrosada en la parte ventral de la pared auricular que será el septo primitivo.

En el tubo cardíaco hay un segmento que conecta al atrio primitivo con el ventrículo primitivo y recibe el nombre de canal atrioventricular. En su interior la gelatina cardíaca forma dos abultamientos denominados cojines endocárdicos, uno ventral y uno dorsal.

En la **etapa 9** se hacen presentes 19 pares de somitas y ya es visible una curva interna en el corazón y el tejido del cojín participa en la formación de las válvulas atrioventriculares (Figura 5A). El bucle cardíaco se sigue desarrollando y la curva distal del tubo se mueve hacia el ápice del ventrículo (Figura 4B). Se puede observar como un tubo plegado en la última fase de "S" como lo describe Männer (2000, 2009). La gelatina cardíaca todavía está presente tanto en la aurícula como en la parte ventricular del corazón y comienza con signos de delaminación celular. Para la **etapa 10** ya se han desarrollado 24 somitas y se hacen presentes las 4 yemas de las extremidades en el embrión. El tracto de salida se sigue moviendo mientras que el atrio se ha expandido y por detrás de éste se han desarrollado las venas cardinales anterior y posterior (Figura 4B). Las trabéculas, estructuras que dan resistencia para aumentar la contracción del corazón, se siguen desarrollando en el ventrículo.

En esta misma etapa de desarrollo se inicia la formación del septo interatrial que separará el atrio izquierdo del derecho. En el atrio, los músculos pectinados comienzan a desarrollarse. Los cojines son ahora distintos y pasarán a formar el tabique atrioventricular. Para la **etapa 11** hay presentes 31 pares de somitas y el atrio está ahora parcialmente dividido por el septo interatrial. El mesocardio dorsal ha avanzado y contiene vacuolas que se unen para formar la vena pulmonar. La delaminación de células endocárdicas es muy clara en la parte interna de los cojines (Figura 5B). Las trabéculas ahora son más altas que anchas. En la parte distal del tracto de salida se ven claramente dos cojines proximales. La curvatura interna del corazón está revestida con tejido endocárdico (Figura 5B).

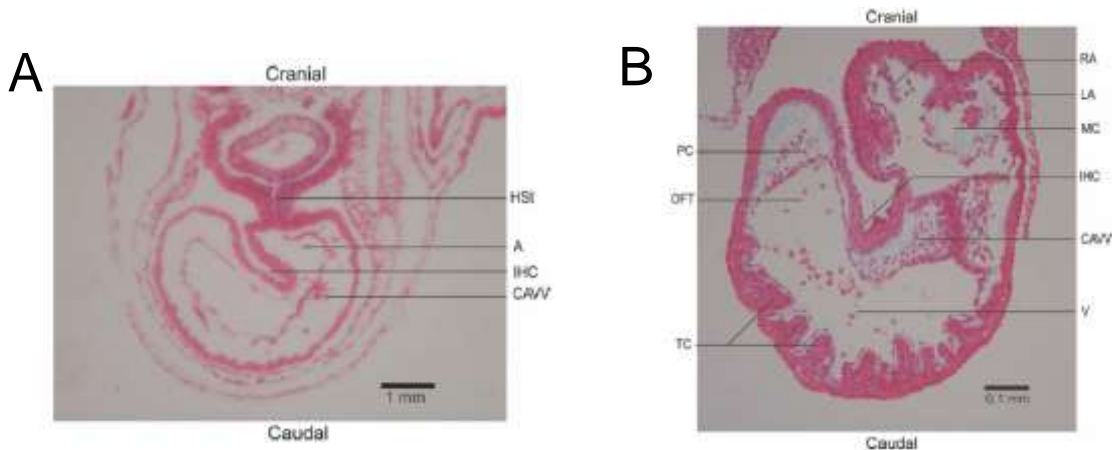


Figura 5. Corte histológico del corazón de un embrión de *Emys orbicularis* en **etapa 9** (A) y **etapa 11** (B). A=atrio, CAVV=tejido del cojín formando la válvula atrioventricular, HSt=tallo del corazón, IHC=curva interna del corazón, LA=atrio izquierdo, MC=capa mesenquimal, OFT= tracto de salida, PC= cojines proximales, RA=atrio derecho, TC= trabéculas, V=ventrículo (Tomado de Bertens *et al.*, 2010).

El embrión en la **etapa 12** ha dado un giro hacia su lado izquierdo y la retina está pigmentada. El *septum primum* se extiende sólo a la mitad de la longitud de la aurícula (Tabla 2). En los atrios se pueden observar pequeños músculos pectinados y pequeñas cantidades de gelatina cardíaca y el tracto de salida sigue sin dividirse.

En la **etapa 14**, los procesos nasales maxilares y laterales se han fundido y las extremidades anteriores están en la etapa de padel. La gelatina cardíaca ha desaparecido. En el tracto de salida se pueden observar seis cojines endocárdicos, dos cojines proximales y cuatro distales que no se han fusionado (Figura 6A).

En la **etapa 15** el corazón está en la quinta fase descrita por Männer (2000, 2009) donde ocurre la **septación cardíaca**. El ápice caudal de la curva ya ha formado la cavidad pulmonar (Figura 6B) y la pared emergida entre éste último y el resto del ventrículo ha formado el septo horizontal (Figura 6E). Las aurículas y el ventrículo están separados por un canal atrioventricular, en el que los cojines atrioventriculares están suspendidos (Figura 6C). El ventrículo se observa muy trabeculado (Figura 6D) y una de estas trabéculas es ligeramente más grande y forma el septo vertical que divide la cavidad venosa de la arterial (Figura 6E).

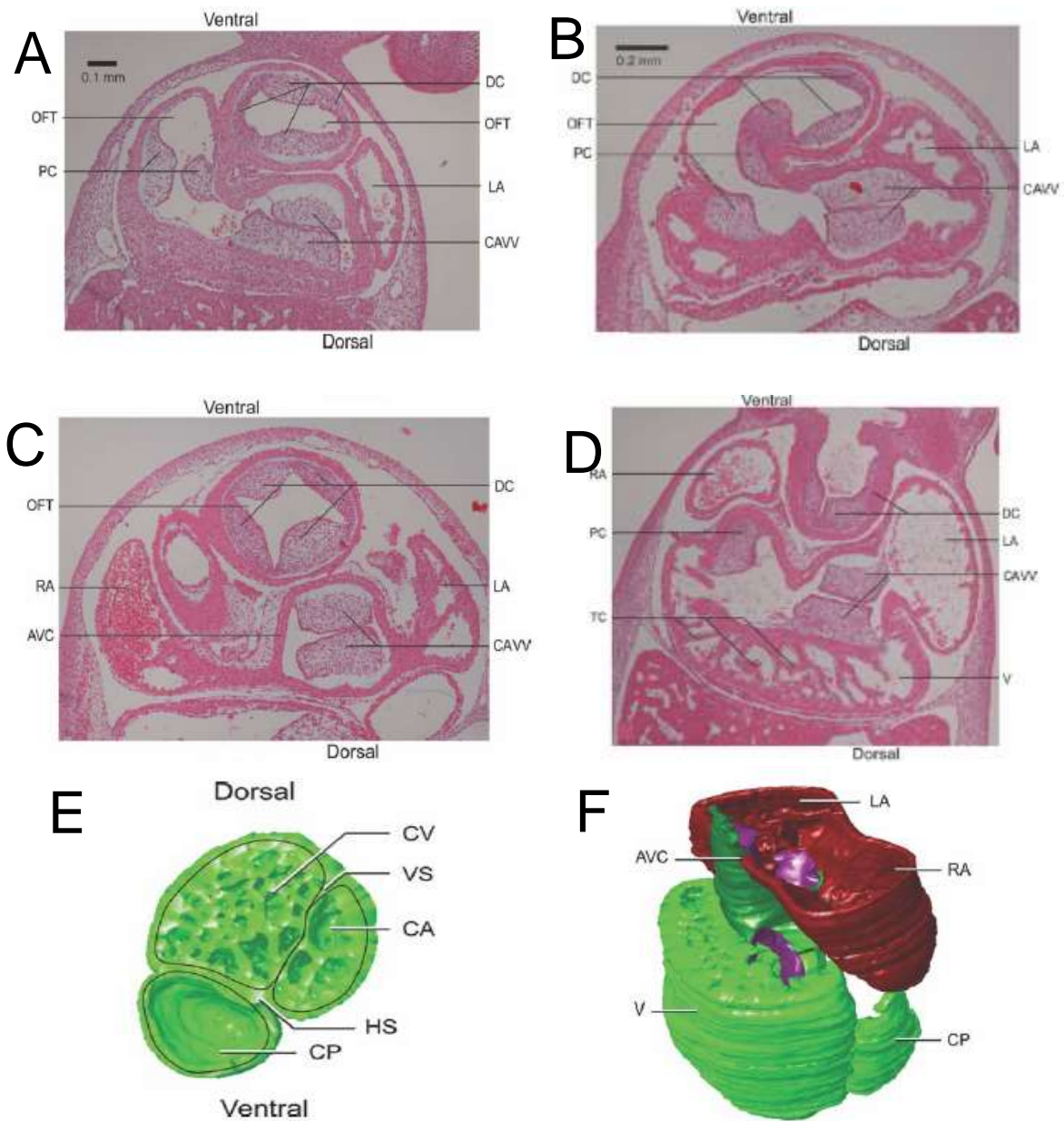


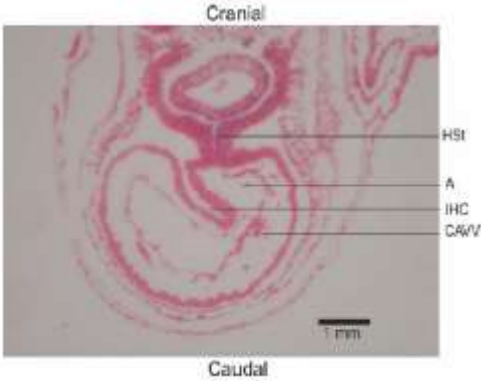

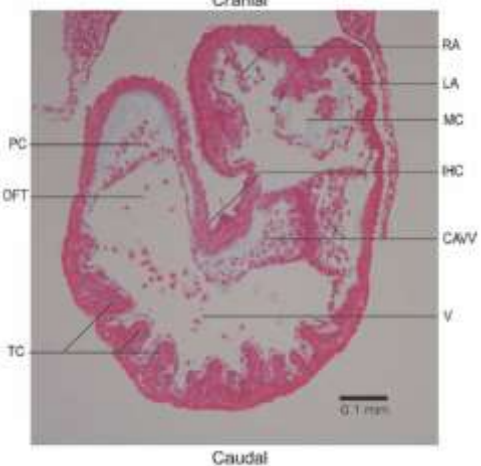



Figura 6. Cortes histológicas del corazón de *Emys orbicularis* en **etapa 14** (A-B), **etapa 15** (B, C, D) y modelos en 3D de la vista del corazón en **etapas 15-16** del desarrollo embrionario (E-F). AVC= canal atrioventricular, CA=cavidad arterial, CAVV=tejido del cojin formando la válvula atrioventricular, CP=cavidad pulmonar, CV=cavidad venosa, CVV=vena cardinal común, DC=cojines distales, HS=septo horizontal, LA=atrio izquierdo, OFT= tracto de salida, PC=cojines proximales, PM= músculo pectinado, PV=vena pulmonar, RA=atrio derecho, TC=trabéculas, V=ventrículo, VS=septo vertical. (Tomado de Bertens *et al.*, 2010).

En la **etapa temprana 16** el corazón del embrión ya tiene bien **formado un ventrículo**, sus **dos atrios derecho e izquierdo**, el canal atrioventricular y la cavidad pulmonar que recibirá sangre y la dirigirá a la circulación pulmonar (Figura 6F).

En resumen, hay cuatro hitos críticos que incluyen los cambios más importantes en el desarrollo cardíaco que permitirán al corazón optimizar las capacidades esenciales de bombeo: (1) desarrollo de un corazón en forma de “S” por donde corre la vena vitelina en la etapa 12 (Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2009); (2) inicio de la septación cardíaca para dividir al corazón en aurícula y un ventrículo (etapa 14); (3) el establecimiento de estructuras como el *septum primum* que divide a la aurícula en izquierda y derecha establecido en la etapa 15 o etapa 17 de acuerdo con Bertens *et al.* (2010) y Koshiba-Takeuchi *et al.* (2009), respectivamente; (4) la formación del septo interventricular que se establece en la etapa 21 de acuerdo con Koshiba-Takeuchi *et al.* (2009) para la tortuga *Trachemys scripta* y la tortuga galápagos *Emys orbicularis*, respectivamente.

Estos trabajos nos permiten identificar e inferir el grado de desarrollo del corazón a través de dichas etapas fundamentales (Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente) en función de las fases de desarrollo de acuerdo a rasgos morfológicos monitoreados en esta tesis y que son análogas a las de las otras especies de tortugas en las que se estudió el desarrollo cardíaco.

Tabla 2. Desarrollo de corazón en tres etapas embrionarias clave de la tortuga *Emys orbicularis* (Bertens *et al.*, 2010) y la correspondencia en morfología corporal en *Chelydra serpentina* (Yntema, 1968).

Etapa y grado de desarrollo de corazón en <i>Emys orbicularis</i>	Morfología de embriones de <i>Chelydra serpentina</i> según la descripción de Yntema (1968)	Rasgos sobresalientes
		<p>Corazón: Desarrollo inicia como una protuberancia hasta la formación de un tubo en forma de “S” que dará lugar al atrio posteriormente, la primera cavidad. Tejido participa en la formación de válvulas atrioventriculares.</p> <p>Cuerpo: La primera hendidura faríngea está abierta. El tubo amniótico caudal se ha formado.</p>
		<p>Corazón: El atrio como primera cavidad ya está bien formada y surge un <i>septum primum</i> que separa sólo hasta la mitad el atrio izquierdo del derecho. Las trabéculas dan resistencia a la contracción del corazón. Comienza la septación cardíaca, separando el atrio del ventrículo.</p> <p>Cuerpo: El proceso maxilar y mandibular se extiende. Las extremidades se observan como yemas cortas.</p>
		<p>Corazón: Ocurre la septación cardíaca dividiendo al atrio izquierdo del derecho por completo. Se forma la cavidad pulmonar. El corazón ya posee tres cámaras bien definidas: dos atrios (izquierdo y derecho) y un ventrículo. Desarrollo de septo horizontal y el septo vertical que divide la cavidad venosa de la arterial.</p> <p>Cuerpo: Se comienza a observar los bordes del caparazón. La placa digital está bien formada sin ranuras. Los radios del iris son evidentes.</p>

*Abreviaturas: **A**=atrio o aurícula, **CAVV**= tejido que forma las válvulas atrioventriculares, **DC**= cojines distales, **HSt**= tallo cardíaco, **IHC**= curvatura interna del corazón, **LA**=atrio izquierdo, **MC**=capa mesenquimal, **OFT**= tracto de salida, **PC**=cojines proximales, **RA**=atrio derecho, **TC**=trabéculas, **V**= Ventrículo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Estudios sobre impactos de temperatura

En fechas recientes ha aumentado el interés en el conocimiento sobre procesos básicos de la biología de las tortugas marinas que nos ayudarán a predecir impactos del cambio climático sobre la dinámica de sus poblaciones y su distribución geográfica. El desarrollo de modelos predictivos depende de una mejor comprensión de la tolerancia que presentan los organismos durante cambios en las condiciones ambientales. Una respuesta obvia de las especies ante condiciones ambientales adversas es un desplazamiento hacia sitios adecuados. Sin embargo; no todos los organismos, ni todas las etapas son capaces de responder rápidamente. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario particularmente para especies ovíparas, cuyos embriones son relativamente pequeños, inmóviles y tienen una capacidad muy limitada para autorregular su temperatura, esto es imposible (Du *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2014).

A pesar del renovado interés y la urgencia del tema, existen pocos estudios sobre la gama de impactos ocasionados por temperaturas elevadas en embriones de tortugas marinas. En otros reptiles, como lagartijas, se ha determinado la tolerancia al estrés térmico mediante observaciones de la temperatura máxima a la cual el animal puede aún responder a estímulos mecánicos, usualmente referida como la *temperatura subletal* (Angilletta *et al.*, 2013).

En tortugas marinas se ha investigado el intervalo térmico viable para la etapa embrionaria. Hendrickson (1958), fue el primero en documentar temperaturas en nidos *in situ* en la tortuga verde (*Chelonia mydas*) de Malaya y Sarawak, encontrando que se requerían temperaturas de por lo menos 35°C para una eclosión exitosa. Posteriormente se incubaron huevos de esta misma especie en condiciones de laboratorio a diferentes temperaturas constantes (15°, 20°, 27°, 32° y 38°C), donde se obtuvieron resultados que a 38°C no eclosionó ningún huevo y a 32°C hubo una eclosión relativamente baja del 60% (Bustard & Greenham, 1968).

Al darle seguimiento al estudio se lograron resultados que mostraron que a temperaturas entre 33 y 35°C hubo un éxito de eclosión del 60%, por lo que se sugirió que, en incubación artificial, los embriones en desarrollo pueden resistir temperaturas altas moderadas de por lo menos hasta 35°C (Bustard, 1971). Posteriormente, se incubaron huevos a temperaturas constantes entre 35 y 37°C para examinar cual es el límite letal, pero no se obtuvieron resultados significativos. En contraste se reportó supervivencia de embriones incubados a

temperaturas mayores de 40°C (Drake & Spotila, 2002). Estos resultados resaltan la alta vulnerabilidad de la etapa embrionaria a temperaturas extremas y variaciones entre diferentes estudios y/o especies.

En otros casos, con la tortuga caguama (*Caretta caretta*) se obtuvo un 71% de eclosiones cuando se incubaron a 32°C, mientras que a 35°C no se obtuvo ningún nacimiento, lo que indica que el límite letal es de por lo menos 35°C pero podría ser aun menor ya que no se probaron temperaturas intermedias. Para la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) en Costa Rica, se encontró que etapas embrionarias de esta especie pueden sobrevivir a temperaturas mayores de 38°C debido a que presentan una tasa metabólica muy alta en su desarrollo embrionario. En nidos de tortuga kikila (*Natator depressus*), especie endémica de Australia, observaron que excediendo una temperatura de 35°C resultan en una tasa exitosa de eclosión de hasta 95%. Estos mismos resultados se han observado para los nidos de tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), dando como un mínimo de un nido eclosionado exitosamente a 34.6°C y variando desde un intervalo de 33.5° a 36°C (Howard *et al.*, 2014).

Esta diferencia de tolerancia a temperaturas en estas las especies se puede atribuir a las diferentes condiciones ambientales de sus hábitats. De la misma forma, la discrepancia en los resultados se puede deber al aumento de temperatura conforme transcurre el periodo de incubación, así como los cambios de temperatura estacionales, la humedad y la tasa metabólica que producen las últimas etapas del desarrollo embrionario, según sea la especie.

Los estudios de incubación a temperaturas naturales en los nidos nos proveen una importante información sobre los intervalos de temperatura que los embriones de tortugas marinas pueden resistir para alcanzar un proceso de eclosión exitoso. Sin embargo, aún no se logra esclarecer cómo las fluctuaciones de temperatura interactúan con los estadios de desarrollo embrionario de tal manera que la tolerancia térmica en una incubación va cambiando.

Investigaciones recientes sobre la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) se han acercado para responder a estas incógnitas. Se ha registrado que durante la incubación a temperaturas por arriba de 35°C en Costa Rica, se reducen significativamente las eclosiones, de acuerdo al número de días que permanecen por arriba de 35°C. Estos resultados sugieren que algunos embriones de tortuga golfina pueden sobrevivir a cortos periodos por arriba de los 35°C, si el resto del periodo de incubación estuvo por debajo de dicha temperatura. Adicionalmente, sugiere que estadios tempranos del desarrollo

embrionario pueden ser más sensibles a temperaturas altas que las etapas tardías (Valverde *et al.*, 2010).

Los estudios clásicos en este tema concluyeron que bajo condiciones naturales los huevos tienen un éxito de eclosión a temperaturas entre 24 y 33° C (Miller, 1985) y que el intervalo de tolerancia térmica (*Thermal Tolerance Range*, TTR) en el desarrollo embrionario es alrededor de 25 a 27°C y de 33 a 35° C, de acuerdo con la especie (Ackerman, 1997).

Además, Miller (1985) cita varios estudios haciendo referencia a que durante la incubación en condiciones naturales o de campo, la temperatura óptima para tener un éxito de eclosión alto es superior a 33°C, con un máximo de 35 a 37°C. Sin embargo, más tarde Miller establece que los huevos incubados a temperaturas superiores a 33°C durante periodos prolongados no eclosionan, sin embargo Ackerman (1997) indica que existen temperaturas que los embriones pueden tolerar fisiológicamente de hasta 35°C. Es claro que bajo la influencia del cambio climático y las condiciones ambientales de cada playa, donde hay sitios más cálidos que otros, la tolerancia fisiológica de los embriones actúa de diferente manera en el desarrollo embrionario y el éxito de eclosión de cada especie.

Han existido diversos obstáculos para sistematizar la respuesta a temperaturas extremas en embriones de reptiles. Uno de los avances metodológicos que ha facilitado este trabajo ha sido la capacidad para registrar la frecuencia cardíaca en embriones amnióticos sin perturbar su desarrollo y su crecimiento (Lierz *et al.*, 2006; Du & Shine, 2008). Cambios en la actividad cardíaca revela respuestas fisiológicas ante incrementos de temperatura, provocando una aceleración cardíaca, debido a la distribución de oxígeno y nutrientes para satisfacer la demanda metabólica del cuerpo (Du *et al.*, 2010). Pero el ritmo cardíaco no puede acelerarse indefinidamente e indudablemente a cierta temperatura el corazón latirá con menor fuerza o hasta cesar y el organismo morir. Estos cambios en el rendimiento cardíaco se han usado para inferir límites térmicos en animales adultos ectotérmicos (Stillman & Somero, 1996).

Aprovechando estas metodologías Angilletta *et al.* (2013) realizaron ensayos que permitieron estudiar los impactos de aumentos en la temperatura de incubación sobre la frecuencia cardíaca en cuatro diferentes poblaciones de una especie de lagartija provenientes de una gama geográfica con hábitats diferentes. Los resultados permitieron inferir temperaturas letales durante el desarrollo embrionario, mostrando que todas las poblaciones tienen un patrón de sensibilidad térmica similar. La frecuencia cardíaca aumentó entre los 37° y 41°C, se mantuvo estable entre los 41° y 44°C y declinó

bruscamente entre los 44° y 46°C, sin embargo; no se observó ningún embrión con paro cardíaco, esto indica que la temperatura subletal está por debajo de los 46°C. A pesar de estas presiones en los cambios de temperatura, estos resultados demuestran que el proceso de evolución se conserva en el grupo taxonómico, permitiéndoles desarrollar estrategias de supervivencia frente a modificaciones que puedan sufrir sus hábitats. Independientemente de la aportación al conocimiento sobre el contexto filogenético, este estudio ofrece una metodología útil y aplicable a diversas especies amnióticas como las tortugas marinas.

2.2. Ciclos circadianos en ritmo cardíaco en otros reptiles

El ritmo cardíaco es un proceso fisiológico, el cual fluctúa cíclicamente en respuesta a factores externos, siendo un importante índice metabólico que es controlado por una constante regulación en el organismo, pero es afectado por algunos otros estímulos, tales como la temperatura ambiental, patrones de actividad física y por las hormonas.

Los ciclos circadianos son manejados endógenamente por fluctuaciones ya sea bioquímicas, fisiológicas o procesos de comportamiento en ciclos de 24 horas, que se manifiestan de acuerdo a diferentes señales. Por ejemplo en los mamíferos, el ritmo cardíaco en los fetos se sincroniza de acuerdo a los procesos fisiológicos de la madre durante los últimos estadios de gestación (Mirmiran *et al.*, 1992), mientras que en algunos organismos ovíparos como es el caso de las tortugas debido a que no hay un cuidado parental, estos ciclos pueden no presentarse debido a que los huevos que son depositados bajo tierra no captan estas fluctuaciones que ocurren en su entorno tales como la duración de luz/oscuridad, señales de la madre e incluso las oscilaciones en las temperaturas ambientales (Loudon *et al.*, 2013).

De acuerdo con Akiyama *et al.* (1999), el ritmo cardíaco en embriones de pollos de engorda (*Gallus gallus domesticus*) en condiciones carentes de temperatura y luz oscila en frecuencia y magnitud en ciclos de 40-90 minutos. Sin embargo; esto no muestra un ciclo diurno como tal. En contraste, hay ciclos circadianos que se establecen en los primeros días de desarrollo en embriones de cinco especies de serpientes y que reflejan en fluctuaciones diarias que repiten en los adultos (Dmi'el, 1969).

Recientemente se cuentan con varios estudios que demuestran que los ciclos circadianos están regulados por la actividad metabólica del núcleo supraquiasmático en mamíferos, un ejemplo de ello son los roedores, mientras que en los reptiles estos ciclos

son generados y controlados por la glándula pineal (Tosini & Menaker, 1996). Estudios como estos han sido bastante estudiados en mamíferos, sin embargo; hay muy pocos autores que han investigado acerca de los ciclos circadianos en embriones de especies ovíparas. Tal es el caso de Tosini *et al.* (2001) quien expresa que los ciclos circadianos no sólo varían en el rol que juegan los órganos entre las especies, sino también en cómo éstos funcionan a través del cambio estacional.

De acuerdo al estudio de Loudon *et al.* (2013), los ciclos circadianos en embriones de tortuga del Río Murray (*Emydura macquarii*), especie endémica en el sureste de Australia, fueron demostrados bajo condiciones de laboratorio a constantes temperaturas y ciclos de luz durante la incubación, lo cual aporta una primera evidencia de que los ritmos cardíacos en especies ovíparas experimentan un ciclo circadiano que fue detectado sin la influencia de condiciones ambientales externas. Asimismo, este experimento fue apto para conocer que el ritmo cardíaco en los embriones fue detectado a mitad del desarrollo embrionario, entre las etapas de desarrollo entre 19 y 22 en el periodo de incubación. No obstante, es probable que los ciclos circadianos se establezcan en etapas tempranas, pero a falta de un buen equipo no se logró observar el ritmo cardíaco al inicio del desarrollo.

Además, se señala que los ciclos circadianos deben ser un importante mecanismo o señalamiento para sincronizar patrones de actividad entre embriones del mismo nido. Ya que se sabe que *Emydura macquarii*, tiene la habilidad de compensarse metabólicamente durante su embriogénesis, al ir aumentando tasas de metabolismo en presencia de otros embriones (McGlashan *et al.*, 2012). Esto podría proveer un mecanismo a través del cual, los embriones menos desarrollados puedan aumentar sus tasas de desarrollo para facilitar su eclosión y establecer una sincronía de eclosión entre los demás embriones.

3. ESPECIE DE ESTUDIO

3.1. Anatomía

La tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, es la especie más pequeña de las tortugas marinas, lo que le confiere que su cuerpo sea muy ligero. Los adultos se caracterizan por tener un caparazón de forma redondeada y posee una cabeza de forma triangular con dos escamas prefrontales y pico córneo no aserrado, mientras que las crías suelen tener la cabeza más grande que el resto de su cuerpo y caparazones más largos que anchos (Márquez, 1990). Los adultos pesan entre 30 y 45 kg., el largo del carapacho en línea recta es de 55 a 75 cm (Abreu-Grobois, 1999).

El caparazón tiene más de 15 escudos mayores, cinco dorsales y frecuentemente con cinco o más pares laterales, el primero de ellos siempre está en contacto con el escudo precentral. El pastrón posee cuatro escudos inframarginales con pequeños poros (Frazier, 1983). La cola del macho es muy larga y posee dos garras en cada una de sus aletas.

Su alimentación abarca una amplia variedad de animales presentes tanto en el bentos como del neuston: camarón, medusas, cangrejos, caracoles, tunicados y, en algunas áreas, también de algas (Márquez, 1990). La golfina es una especie que posee una distribución pantropical, es decir, se le puede encontrar en todas las áreas tropicales del mundo (Márquez, 1990).

Durante la temporada de anidación ocurre generalmente durante el verano y el otoño, la tortuga golfina suele salir en arribazones donde miles de hembras llegan a la playa después de viajar miles de kilómetros dentro del mar (Márquez, 1990) sin embargo también pueden llegar individualmente como es el caso de la playa “El Verde Camacho”.

4. JUSTIFICACIÓN

El determinar la tolerancia de embriones a temperaturas en los extremos de la gama considerada viable y las temperaturas letales para diferentes etapas de su desarrollo embrionario resulta fundamental para identificar con precisión el nivel de vulnerabilidad y dimensionar los impactos a las poblaciones de tortugas marinas por aumentos proyectados en la temperatura ambiental en el contexto del calentamiento global.

Sabemos que los organismos dependen de su capacidad de resiliencia para sobrevivir a las fluctuaciones de temperatura. En el caso de las tortugas marinas, los embriones son depositados en la playa y en la ausencia de un cuidado parental quedan expuestos a las condiciones del ambiente dentro de los nidos. Por ende sus respuestas fisiológicas pueden ser críticas para hacer frente a los cambios de temperatura ambiental (Tedeschi *et al.*, 2016).

Hasta el momento no hay estudios en tortugas marinas que comparen la vulnerabilidad de las diferentes etapas embrionarias a cambios ambientales. Es lógico pensar que en las primeras etapas los embriones sean más vulnerables al no contar con una capacidad fisiológica robusta. Debido a que este tema no se ha investigado, se justifica el aplicar nuevos enfoques para comparar las capacidades de embriones en diferentes etapas de desarrollo, así como provenientes de diferentes madres.

Los escenarios proyectados para el cambio climático, además de aumentos en la temperatura media mundial (2-3°C para el año 2100) (IPCC, 2007; Hansen *et al.*, 2006)

incluyen incrementos en la frecuencia y duración de fenómenos climáticos extremos como olas de calor. Dado que serían los embriones los que fundamentalmente estarán afectados por modificaciones al régimen térmico, el impacto sería debido a dos fenómenos: aumento en la temperatura media, y ocurrencias de períodos cortos pero a temperaturas elevadas. Los límites de tolerancia térmica para las tortugas marinas han sido descritos y estos valores probablemente serán lentamente rebasados. Sin embargo, debido a que se ha observado supervivencia de embiones bajo temperaturas muy superiores a los límites letales conocidos hasta ahora, siempre y cuando sean de corta duración (Howard *et al.*, 2014) resulta necesario investigar las capacidades de tolerancia de estas especies a condiciones de estrés agudo para mejor comprender y dimensionar las posibles afectaciones por los aumentos en las frecuencias y duración de eventos térmicos extremos. Para ninguna especie de tortuga marina se conoce el límite letal superior de temperatura, bajo estas condiciones.

Ante los vacíos de conocimiento anteriores, este trabajo tiene como principal objetivo analizar los cambios en el ritmo cardíaco de embriones cuando se someten a cambios agudos de aumento de temperatura y en diferentes fases de su desarrollo embrionario. El esclarecimiento de los límites de tolerancia térmicos para cada fase permitirá visualizar la viabilidad de los embriones en temperaturas estresantes para proyectar los resultados hacia condiciones naturales dónde se presentan eventos extremos.

La información adquirida en este trabajo será útil para mejorar las estrategias de incubación con manejo de temperaturas, lo que podrá dimensionar realísticamente las mortalidades en anidaciones *in situ* en función de eventos de temperaturas extremas de corta duración. Asimismo, será útil para guiar las prácticas de manejo en campamentos tortugeros donde se realiza la conservación y protección de tortugas marinas para optimizar su cuidado. Actualmente, en México la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 cataloga a todas las especies de tortugas marinas como en Peligro de Extinción y requiere la implementación de prácticas de conservación para garantizar su reproducción.

5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

En la tortuga golfinia, *Lepidochelys olivacea*,

¿Qué factor ejerce una mayor influencia sobre la tasa de crecimiento embrionario: el nido de origen o la temperatura de incubación?

¿Existe un ciclo circadiano en el ritmo cardíaco de los embriones? y de ser así, ¿hay una sincronización entre embriones del mismo u otros nidos vecinos?

¿Existen diferencias en el ritmo cardíaco durante las fases de desarrollo embrionario entre temperaturas, sexos y nidos de procedencia?

¿Existe alguna influencia del sexo, de la temperatura de incubación y del nido de origen sobre la tolerancia térmica de embriones durante diferentes fases de su desarrollo embrionario?

6. HIPOTESIS

- 1) El efecto de la temperatura de incubación es mayor que el de nido de origen sobre la tasa de crecimiento de embriones en incubaciones a 28°C y 32°C.
- 2) Existe un ciclo circadiano en las variaciones del ritmo cardíaco de embriones y éste está sincronizado entre embriones del mismo o diferentes nidos cercanos.
- 3) La temperatura de incubación de los embriones afecta el ritmo cardíaco basal, aumentando el valor conforme sea mayor la temperatura.
- 4) Habrá diferentes niveles de efecto del estrés térmico sobre ritmo cardíaco para embriones de distintos nidos.
- 5) El límite mortal superior de temperatura es diferente para las diferentes fases del desarrollo embrionario y es detectable con el patrón de ritmo cardíaco embrionario.
- 6) El ritmo cardíaco del embrión es más vulnerable conforme se calienta de manera aguda la temperatura ambiental y es menor su frecuencia cardíaca en etapas maduras.

7. OBJETIVOS

7.1. General

Evaluar la tolerancia térmica de embriones de la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, durante diferentes etapas de su desarrollo mediante el análisis de su ritmo cardíaco.

7.2. Particulares

- Comparar el efecto de diferentes nidos y dos temperaturas (28° y 32°C) sobre la tasa de crecimiento de embriones

- Analizar el ritmo cardíaco de embriones durante 24 h para determinar si existe (a) algún ciclo circadiano y (b) sincronización entre embriones del mismo nido o entre nidos.
- Comparar los patrones del ritmo cardíaco y el límite mortal superior de temperatura en embriones de diferentes nidos y en diferentes etapas de desarrollo expuestos a incrementos de temperatura.

8. AREA DE ESTUDIO

Los nidos de tortuga golfina han sido tomados del “Campamento Tortuguero el Verde Camacho” de la CONANP ubicado entre los paralelos 23°00'00" N, 106°12'00" W y 22°46'54" N, 106°00'00" W (D.O.F., 1986) dentro del litoral del municipio de Mazatlán, Sinaloa en el Noroeste de México (Figura 7).

El hábitat del “Campamento Tortuguero El Verde Camacho” es una playa índice para áreas de no arribada de la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea* (Briseño-Dueñas, 1980) catalogado como Santuario de Tortugas Marinas por la CONANP en 2001 y representa la playa de anidación más importante para la reproducción de la tortuga golfina en el estado de Sinaloa.



Figura 7. Ubicación del sitio de colecta en el Santuario de Tortugas Marinas en la playa de El Verde Camacho, Sinaloa.

El área adyacente a la playa de anidación en el Verde Camacho, cuenta con nueve sistemas estuarinos y marismas, los cuales aportan al mar un gran pulso de energía a la zona costera. El humedal costero de mayor tamaño es El Verde que es alimentado por el flujo estacional del Río Quelite. Dicha riqueza de humedales de agua dulce, salobre y marina son utilizados como área de reproducción, crecimiento, refugio y alimentación por una alta diversidad de especies, entre las que destacan: aves residentes y migratorias, otros reptiles además de las tortugas y mamíferos terrestres clasificados como especies en riesgo.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Metodología general

Trabajo de campo y traslado de huevos de la playa al laboratorio

Se extrajeron en total cinco nidos (tres en marzo y dos en agosto del 2016) de tortuga golfina de la playa de “El Verde Camacho”, bajo un permiso de Colecta Científica en Materia de Vida Silvestre en Modalidad por Proyecto emitidos por la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (DGVVS/SEMARNAT) que se identifica con el oficio núm. SGPA/DGVVS/14703/15, el cual tuvo vigencia de un año a partir de su fecha de emisión (9/12/15) cubriendo nuestros muestreos realizados. Este permiso es requerido debido a que las tortugas marinas se encuentran catalogadas como especie en peligro de extinción de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010.

Para dicha colecta se colaboró con los biólogos del Campamento de Conservación para estar presentes en los momentos que se localizan hembras anidando para poder obtener los datos biométricos de las madres, además de recoger la nidada fresca. Al momento de obtener las nidadas, se contaron los huevos y se trasladaron a hieleras de poliestireno cubiertos con una cama de arena húmeda para amortiguar los cambios de temperatura y movimiento del traslado. El traslado al laboratorio de Genética es de menos de 50 minutos y al llegar se rotularon con códigos identificando el nido y cada huevo con lápiz no tóxico y se registró el diámetro y peso. Posteriormente se distribuyeron los huevos en incubadoras con regulación térmica controlada por microprocesadores de arquitectura abierta *Arduino* construidas *ex profeso* y situadas dentro de un cuarto de temperatura controlada a 22°C. Previo a cada experimento se calibraron los sensores de temperatura para la charola de los

huevos (5) y el fondo de la incubadora (1) utilizando un termómetro de referencia de mercurio con calibración certificada a una exactitud de 0.1°C.

9.1.1. Incubación

Sistemas de incubación

Se utilizaron diversos números de incubadoras basadas en hieleras comerciales Coleman® de 51 y 94.6 litros de capacidad dependiendo de las necesidades de los experimentos. En cada una se mantuvo 10% del volumen de la hielera como agua purificada en el fondo de la incubadora, con la finalidad de mantener niveles óptimos de humedad (>90%) para el desarrollo del experimento. El sistema de control de temperatura completo consta de la serie de incubadoras controladas por un microprocesador *Arduino MEGA 2560*. Las incubadoras permanecieron dentro de un cuarto de temperatura controlada con una temperatura ambiental de 22° C, en salas de temperatura controlada de la Unidad Académica Mazatlán (Figura 8).

Asimismo, se colocó un calentador de acuario de 200W con el fin de generar el calor necesario y proveer los niveles necesarios de humedad en el sistema, el cual estuvo controlado por una combinación de microprocesadores de plataforma *Arduino®*. La humedad y el calor generado se mantuvieron homogéneos con un sistema de ventiladores en cada una de las incubadoras.



Figura 8. Fotografías de la distribución y configuración de las incubadoras dentro del cuarto de incubación.

Por otro lado, en el sistema se colocaron sensores que estuvieron conectados a un microprocesador esclavo que enviaba la información al microprocesador central, programado para coordinar las diferentes incubadoras por medio de (1) solicitar periódicamente datos, (2) registrarlos en una memoria SD, (3) calcular ecuaciones que derivan los ajustes del calentador necesario para mantener la temperatura deseada en cada incubadora y (4) enviar el dato de la potencia requerida a cada esclavo.

Los niveles de temperatura dentro de las incubadoras, fueron ajustados modulando el voltaje enviado al calentador, por medio de un sistema de control fase (potencia) denominado TRIAC, el cual se describe más adelante, de acuerdo a las lecturas evaluadas por el microprocesador, con el fin de mantener la temperatura sobre la superficie de los huevos en el valor experimental deseado en cada incubadora. Además, se añadió una circulación de aire dentro de cada incubadora, con ventiladores de computadora modificados para garantizar un régimen térmico homogéneo. Las dos temperaturas que se usaron para los experimentos fueron: 28 y 32°C.

El sistema de control TRIAC que ya se tenía desarrollado en el laboratorio de Genética, se diseñó con la intención de funcionar como un interruptor bidireccional de corriente alterna capaz de regular la potencia de salida en función de la señal proveniente del microprocesador *Arduino*. En el Anexo se muestra un esquema del circuito electrónico utilizado para este proyecto y así pueda ser interpretado y replicado en el diseño de sistemas que requieran una regulación similar.

Además de contar con un cable calentador controlado por programación de la tarjeta *Arduino*, se mantendrá un ambiente húmedo por la presencia de un espejo de agua en el fondo de la incubadora y dos series de ventiladores de 3" para mantener una circulación que garantice la homogenización tanto del aire como de la humedad.

El código *Arduino* utilizado para el sistema fue desarrollado en colaboración con el M.C. Carlos Montoya de la Universidad Politécnica de Sinaloa. Éste sistema se estructura básicamente de dos componentes y las instrucciones para el funcionamiento de los *Arduino* esclavos y el maestro. El código maestro permitió establecer una comunicación con los esclavos para recibir los datos de temperatura en tiempo real y así comparar la temperatura promedio y evaluar por medio de ecuaciones de control por PID (Proporcional, Integral, Diferencial), la potencia necesaria para mantener o acercarnos a la temperatura deseada "*setpoint*".

Los huevos colectados de la playa "El Verde Camacho", fueron colocados dentro de las incubadoras sobre una charola de armazón de PVC y malla de mosquitero ubicada a 20 cm

por encima del espejo de agua (Figura 9), sobre la cual se colocó una cama de vermiculita (vermiculita media nacional, ICAPSA, Culiacán) que cubrió a los huevos en un 90% aproximadamente.

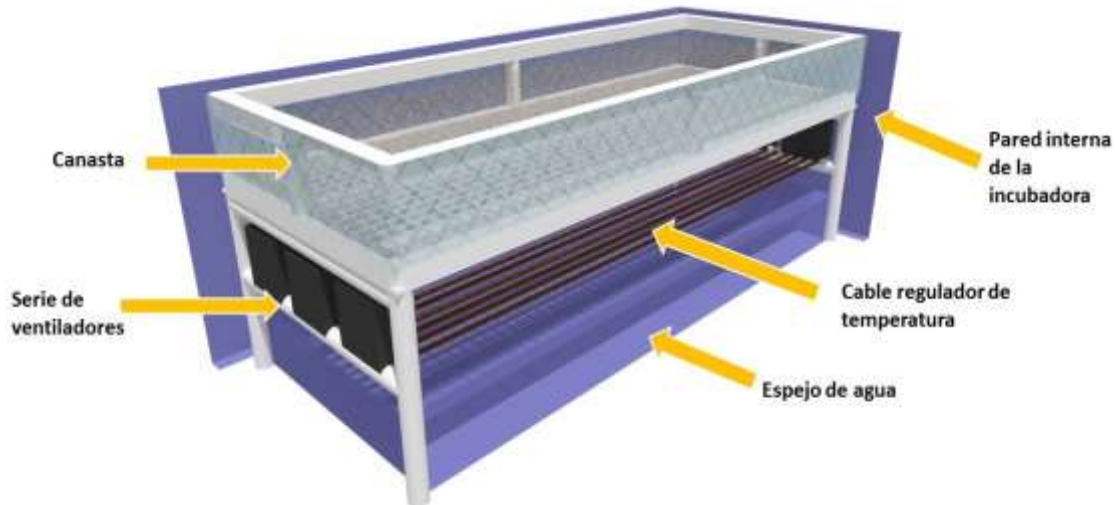


Figura 9. Diagrama de la incubadora y partes que la componen.

El sistema cuenta con sensores digitales DS18B20 para medir la temperatura y se encuentran distribuidos como se especifica en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de los sensores de temperatura dentro y fuera de las incubadoras.

Ubicación	Tipo de sensor
En el depósito de agua	2 sensores digitales de temperatura sumergibles
Sobre la superficie donde están los huevos, en el centro y las cuatro esquinas de la charola	5 sensores digitales de temperatura
En el aire fuera de la incubadora	1 sensor digital de temperatura

Las características de los sensores utilizados para la medición de la temperatura (Figura 10) poseen las siguientes características:

Sensores de temperatura DS18B20:

- Termómetro digital con resolución seleccionable de 9-bit a 12-bit.
- Rango de medición de temperatura de -55° C a 125° C.
- Interface de comunicación 1-Wire. Solo requiere un pin digital de comunicación.
- Código serial de identificación único de 64-bit.
- Precisión de $\pm 0.5^\circ$ intervalo de -10° C a 85° C.
- Alimentación de 3.0V a 5.5V.

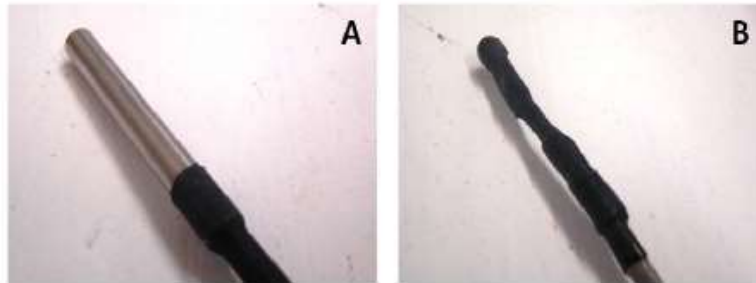


Figura 10. Las dos modalidades de los sensores utilizados: A) sumergible de temperatura DS18B20 con recubrimiento de acero inoxidable. B) sin encapsulado de metal, conectado con soldadura y recubrimiento de thermo-fit para uso entre la Vermiculita.

Calibración de sensores de temperatura

Los sensores tienen una alta resolución y precisión especificada por el productor (MAXIM DS18B20 1-Wire Digital Thermometer). Sin embargo, estos sensores presentan una dispersión en sus mediciones comúnmente, por lo que se aplicó una calibración de las lecturas de temperatura, comparadas con las de un termómetro de cristal con certificación. La calibración consistió en un valor de corrección del error de las lecturas medidas con respecto al del valor del termómetro certificado, que fue ligeramente variable a diferentes temperaturas.

Funcionamiento del código

El código maestro Arduino Mega® 2560 comienza con la inicialización de un reloj, el cual realiza la sincronización de las operaciones en cada incubadora. Continúa con la inicialización del lector de la tarjeta SD, la cual recopila todos los datos analizados (fecha y hora, temperaturas, humedad, output), creándose un archivo “.csv” con la fecha y hora de creación. El primer ciclo comienza realizando una interrupción de la medición de temperaturas, mediante el protocolo de comunicación “I2C[i]”, siendo “i” el número de incubadora, al funcionamiento del esclavo para solicitar las temperaturas de las últimas cinco mediciones de temperatura y humedad almacenadas en la variable “Temps[i]”, con los cuales se obtiene el promedio de las temperaturas. Si alguno de los valores de “Temps[i]” proporcionados por el esclavo, es menor a cero o mayor a 99.99 se considera como valor erróneo y se solicita una nueva medición de todos los parámetros para considerarlos en el promedio. Una vez que se tiene el promedio corregido de errores, se ejecuta la rutina “myPIDi.Compute”, que se encarga de realizar el cálculo de la potencia requerida (proporcional al voltaje por aplicar) de salida (output), mediante el mecanismo de control por retroalimentación de un algoritmo que considera tres parámetros en función del

error: Proporcional, Integral y Derivativo (PID), para cada incubadora el cual es transmitido al esclavo por el mismo protocolo de comunicación "I2C". Una vez finalizada la comunicación de recepción y transmisión de datos en cada incubadora se inicia el ciclo de guardado de la información, generando una cadena con todos los valores, medidos y calculados, los cuales se agregan como un nuevo guion al archivo ".csv" inicialmente creado. Estos ciclos se realizan en un intervalo de tiempo de 10 segundos para cada incubadora, teniendo así lecturas de los promedios de las temperaturas y cálculos de las nuevas variables de salida cada 10 segundos.

El funcionamiento del código esclavo Arduino Uno® comienza con la inicialización de las librerías de los sensores de temperatura y humedad, identificados mediante su número de serie en el orden especificado según su ubicación dentro de la incubadora, los cuales se almacenan en la variable "Temps[i]", así como los pines del sistema regulador de voltaje (control TRIAC). Los sensores realizan una medición permanente cada segundo y corrigen las mediciones en función de su calibración durante el tiempo que se encuentre trabajando la tarjeta "Esclavo", hasta el momento de recibir la interrupción del maestro que solicite la información de la variable "Temps[i]" y proporcione los valores "Output" de la salida de potencia (proporcional de voltaje) de cada incubadora, calculados para calentamiento de cada incubadora, convirtiéndose en valor de la variable "DutyC(i)". Al recibir los cálculos el "Esclavo" ajusta (de ser necesario) el nuevo valor de salida de voltaje (DutyC (i)) para llevar a cabo el nuevo nivel de calentamiento hasta la siguiente interrupción, y poder continuar con las lecturas de los parámetros cada segundo.

9.1.2. Observaciones no invasivas de los embriones

Ritmo cardíaco

Para evaluar el ritmo cardíaco en los embriones de tortuga golfina bajo diferentes condiciones experimentales, se utilizó un monitor digital *Buddy Mk2* (<http://www.avianbiotech.com/Buddy.htm>, Figura 5) desarrollado para huevos de aves pero que ha sido exitosamente empleado en diversos reptiles. Éste emplea sensores de luz infrarroja (IR) para detectar y cuantificar las pulsaciones (Angilletta *et al.*, 2013). Emite un haz fuerte y continuo de luz IR que es reflejado por la cáscara, las membranas internas, los huesos, los músculos y el tejido del huevo, pero el valor es constante. Al mismo tiempo, la absorción de IR que pasa por el flujo de sangre del embrión a través de los vasos sanguíneos es variable de acuerdo al volumen que pasa (o sea el pulso). Como resultado el monitor despliega variaciones que reflejan los cambios en el valor de IR detectada que

son función directa de las pulsaciones. En ocasiones en que el embrión se movía, esto también fue posible detectarlo por el monitor y diferenciado de las lecturas de ritmo cardíaco, además de generar un señalamiento en pantalla indicando que hay interferencia.



Figura 11. Monitor *Buddy Mk2* y sus partes componentes.

Las lecturas de ritmo cardíaco en el monitor (en latidos por minuto, LPM), se realizan con el huevo sobre la almohadilla del sensor y se cierra la tapa del compartimiento, asegurándose que el huevo quede completamente sobre la almohadilla y observando la posición del huevo. Si el pulso no es detectado, se debe apagar el monitor presionando el botón (O), abrir el compartimiento y girar el huevo 90°, repitiendo el proceso (Figura 12).

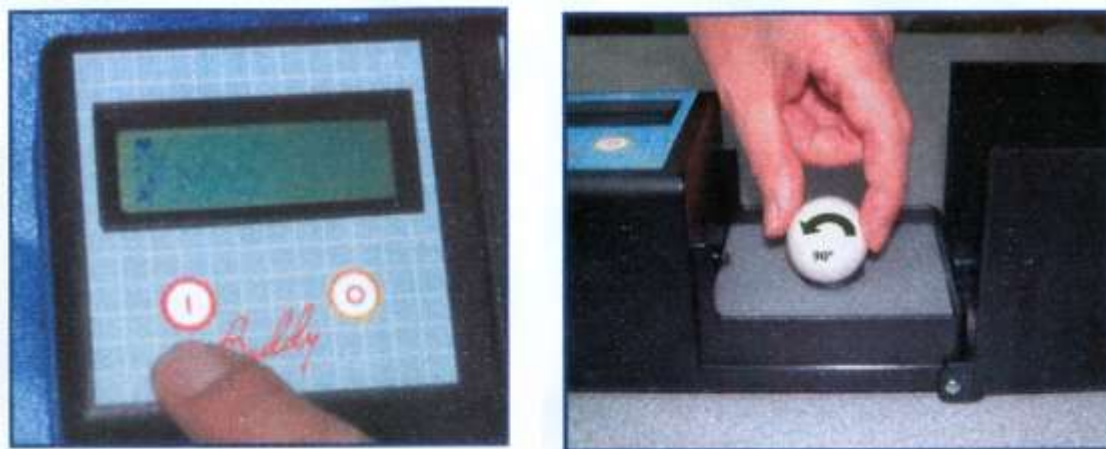


Figura 12. Dar inicio a una lectura en el monitor (izquierda) Girar el huevo 90° (derecha).

Observaciones del embrión con ovoscopio

El ovoscopio (Figura 7) es un aparato que fue adaptado en el laboratorio de Genética a partir de diseños similares empleados en avicultura. Permite visualizar el embrión por medio de iluminación del embrión con una luz blanca transmitida a través del huevo de un foco led de 8W, el cual produce 512 lúmenes. Esta potencia lumínica es equivalente a la de focos de halógeno antiguos de 50W pero con 15% del calor emitido lo que se evita dañar a los embriones pero con suficiente luz transmitida que permite realizar observaciones del huevo tales como verificar la viabilidad del embrión presente o la identificación de rasgos morfológicos relevantes.

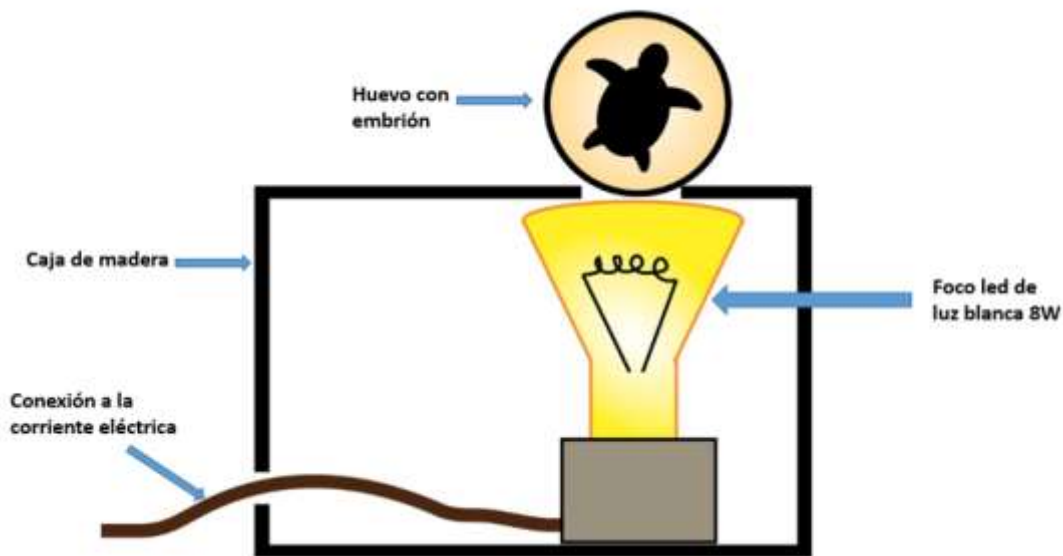


Figura 13. Diagrama del ovoscopio y sus partes que lo componen.

9.1.3. Seguimiento del desarrollo embrionario de tortuga golfina

Para este experimento se colectaron dos nidos en la playa de anidación de El Verde Camacho, Sinaloa, para lo cual se tramitó un permiso ante la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT de acuerdo a la normativa mexicana. Para dicha colecta se colaboró con los biólogos del Campamento de Conservación para que estuviéramos presentes en los momentos que se localizaron las hembras anidando para poder obtener los datos biométricos de las madres y recoger la nidada fresca. Una vez que se detectó a la hembra anidando, se procedió a colocar 30 huevos de cada nido en cajas de poliestireno sobre una cama de arena húmeda para amortiguar los cambios de temperatura y movimiento del traslado, cada huevo se rotuló con el número de nidada y número de huevo con lápiz no tóxico para poder identificarlos al llegar al laboratorio. Estos nidos se

transportaron esa misma noche con el sumo cuidado que se debe hacia las instalaciones del laboratorio de Genética, los huevos fueron pesados con una báscula digital y se midió su diámetro con un vernier. Posteriormente fueron separados y acomodados de acuerdo a su etiqueta en las incubadoras programadas a 28° C y a 32° C.

Los huevos fueron incubados hasta su eclosión sobre las charolas con vermiculita bajo temperaturas constantes y humedad controlada, ambos parámetros son controlados cada minuto por el sistema controlado por un microprocesador. A lo largo del periodo de incubación, los huevos fueron revisados cada cinco días con ayuda de un ovoscopio para determinar la viabilidad de los embriones y poder llevar un registro de la supervivencia. Además, se llevó un registro de la etapa de desarrollo embrionario y el peso de cada huevo cada cinco días a lo largo de la incubación en las distintas temperaturas. El sistema computarizado registró las temperaturas en diferentes secciones de la incubadora, así como de la superficie de los huevos en cuatro puntos de la charola (centro y cuatro esquinas) y el nivel de humedad relativa al nivel de la charola de los huevos. La temperatura se ajustó sobre la base de las lecturas a nivel de la charola de huevos a aquellas requeridas en cada tratamiento.

Durante el proceso de incubación a los huevos de tortuga golfina a dos temperaturas contrastantes (28°C y 32°C) se les tomaron fotografías cada cinco días utilizando el ovoscopio. Del conjunto de embriones se sacrificaron algunos en períodos representativos para obtener registros fotográficos que permitieran su análisis y descripción morfológica a detalle para comparar y corroborar las observaciones del ovoscopio. A dichos embriones diseccionados se les tomó registro de su peso con ayuda de una báscula digital, se anotó tanto el peso del embrión con vitelo como el peso del embrión sin vitelo, ya que podíamos encontrar el vitelo absorbido de acuerdo a la etapa de desarrollo del embrión diseccionado, igualmente se tomó registro fotográfico de estos. Asimismo, a los embriones diseccionados de etapas tardías con ayuda de un vernier se midió la longitud total del pico a la cloaca, esto debido a que el embrión se encontraba de buen tamaño para ser medido a mano, mientras que a los embriones de etapas tempranas se midieron con ayuda del programa *Image J*, el cual es una herramienta que ayuda a calcular el área y las estadísticas de valor de píxeles de la foto seleccionada, con el fin de obtener un registro del crecimiento de los embriones. Esto se repitió diariamente hasta la eclosión de los neonatos (45-60 días).

Cercano al tiempo esperado de eclosión, las incubadoras fueron monitoreadas tres veces por día para registrar el día de eclosión y determinar el tiempo de incubación (en días) para cada tratamiento. Los neonatos eclosionados fueron medidos registrando

medidas estándar en las tortugas marinas, tales como largo recto carapacho (LRC), ancho recto carapacho (ARC) y longitud pico-cloaca, asimismo para ser pesados en la báscula digital, se bañaron para eliminar el exceso de vermiculita que pudieran tener adherida, se secaron con papel y se registró el peso de la cría. Los neonatos fueron marcados en el carapacho con el mismo código que sus huevos de origen y colocados en un contenedor para posteriormente ser liberadas en su playa de origen.

Finalmente, se identificó la etapa de desarrollo embrionario de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), de acuerdo a la descripción de Miller (1985) en base al uso de la ovoscopia y la disección, así se obtuvo un registro fotográfico para observar algunas características morfológicas que pudieran ayudar a su identificación tales como coloración, forma y tamaño de extremidades, carapacho, ojos, cola, entre otras. Los embriones diseccionados fueron fijados en formol 10 días y posteriormente se conservaron en alcohol al 70%.

9.1.4. Desarrollo y crecimiento

Para fines prácticos de este trabajo, se adaptaron de las descripciones de 31 etapas de desarrollo embrionario para tortugas marinas de Miller (1985) a los pasos análogos de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*).

9.1.5. Fases del desarrollo muestreadas

Para los objetivos de este estudio, los tiempos de incubación se estimaron de diversas maneras. Además del número de días transcurridos también se calculó la proporción del período total hasta término para contar con un valor comparable entre incubaciones a distintas temperaturas cuyas duraciones son muy distintas. Finalmente, se dividió en tres tercios el período total y se muestrearon arbitrariamente momentos de las incubaciones equivalentes a 25, 50 y 75% de la duración completa del proceso embrionario. El período completo de incubación es de aproximadamente 45 o 65 días, a 32° y 28°C, respectivamente. Como criterio adicional y debido a que en paralelo a este trabajo se llevaban a cabo estudios sobre el desarrollo sexual en embriones de tortuga golfina, se aprovecharon rasgos morfológicos de embriones en primer tercio, periodo termosensible (PTS) y en periodo sexualmente determinado (SD) de acuerdo con Merchant-Larios *et al.* (1997) como indicativos de los períodos requeridos que podían ser identificados por medio de la ovoscopia que se estuvo validando para esta tesis.

El ovoscopio nos permitió distinguir cambios en rasgos morfológicos asociados con estos períodos y que coinciden con las fases de nuestro interés (1er, 2do, 3er tercio) que están relacionadas a cambios en el nivel de pigmentación en partes del cuerpo que son observables a contra-luz con dicho instrumento, siendo una manera sencilla y eficaz de observar embriones de manera no invasiva. Brevemente, para el primer tercio la pigmentación en el ojo ha iniciado; para el segundo tercio los ojos están totalmente pigmentados, el carapacho inicia una pigmentación mientras que el cuello y la cabeza permanecen sin coloración y en el último tercio del desarrollo toda la cabeza, el cuello y el dorso del carapacho están completamente pigmentados.

Por lo anterior, en varias secciones de esta tesis se utilizan intercambiamente la terminología de los períodos PTS y SD, que hacen referencia a las del primer y segundo tercios (2do, 3er). La duración total de la incubación previa a los muestreos se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Períodos muestreados en dos temperaturas de incubación con su respectiva proporción y duración total de la incubación.

Temperatura de incubación (°C)	Fase del desarrollo muestreada	Tiempo de la incubación al momento de muestreo (d)	Proporción del desarrollo total (%)	Duración total de la incubación (d)
32	Primer tercio (1er)	11.8	0.25	47
	Segundo tercio (2do)	23.7	0.50	
	Tercer tercio (3er)	33.7	0.72	
28	Primer tercio (1er)	No se muestreó	No se muestreó	67
	Segundo tercio (2do)	42.7	0.64	
	Tercer tercio (3er)	47.9	0.71	

9.2. Metodología de los objetivos particulares

9.2.1. Comparar el efecto de diferentes nidos y dos temperaturas (28° y 32°C) sobre la tasa de crecimiento de embriones.

Para este experimento se colectaron dos nidos en la playa de anidación de El Verde Camacho, Sinaloa, los cuales fueron transportados esa misma noche a las instalaciones del laboratorio de Genética, los huevos fueron pesados con una báscula digital y se midió el diámetro del huevo con ayuda de un vernier. Posteriormente fueron separados y acomodados de acuerdo a su etiqueta en las incubadoras programadas a 28°C y a 32°C

(Figura 14) para observar el efecto de diferentes nidos a estas dos temperaturas sobre la tasa de crecimiento de embriones.



Figura 14. Procedimiento aplicado a los huevos colectados previo a su incubación.

Los huevos fueron incubados hasta su eclosión sobre las charolas con vermiculita bajo temperaturas constantes y humedad controlada, ambos parámetros son controlados cada minuto por el sistema controlado por un microprocesador. A lo largo del periodo de incubación, los huevos fueron revisados cada cinco días con ayuda de un ovoscopio para determinar la viabilidad de los embriones y poder llevar un registro de la supervivencia. Además, se llevó un registro de la etapa de desarrollo embrionario y el peso de cada huevo cada cinco días a lo largo de la incubación en las distintas temperaturas. El sistema computarizado registró las temperaturas en diferentes secciones de la incubadora, así como de la superficie de los huevos en cuatro puntos de la charola (centro y cuatro esquinas) y el nivel de humedad relativa al nivel de la charola de los huevos. La temperatura se ajustó sobre la base de las lecturas a nivel de la charola de huevos a aquellas requeridas en cada tratamiento.

Una vez incubados los huevos de tortuga golfina a temperaturas promotoras de machos y hembras (28°C y 32°C, respectivamente) se tomaron fotografías cada cinco días utilizando el ovoscopio. A su vez se extrajo un embrión para realizar su disección, con el fin de tener un registro fotográfico y su descripción morfológica a detalle.

A dichos embriones diseccionados se les tomó registro de su peso con ayuda de una báscula digital, se anotó tanto el peso del embrión con vitelo como el peso del embrión sin vitelo, ya que podíamos encontrar el vitelo absorbido de acuerdo con la etapa de desarrollo del embrión diseccionado, igualmente se tomó registro fotográfico de estos. Asimismo, a los embriones diseccionados de etapas tardías con ayuda de un vernier se midió la longitud total del pico a la cloaca, esto debido a que el embrión se encontraba de buen tamaño para ser medido a mano, mientras que a los embriones de etapas tempranas se midieron con ayuda del programa *Image J*, el cual es una herramienta que ayuda a calcular el área y las estadísticas de valor de píxeles de la foto seleccionada, con el fin de obtener un registro del crecimiento de los embriones. Esto se repitió diariamente hasta la eclosión de los neonatos (45-60 días).

Cercano al tiempo esperado de eclosión, las incubadoras fueron monitoreadas tres veces por día para registrar el día de eclosión y determinar el tiempo de incubación (en días) para cada tratamiento. Los neonatos eclosionados fueron medidos registrando medidas estándar en las tortugas marinas, tales como largo recto carapacho (LRC), ancho recto carapacho (ARC) y longitud pico-cloaca, asimismo para ser pesados en la báscula digital, se bañaron para eliminar el exceso de vermiculita que pudieran tener adherida, se secaron con papel y se registró el peso de la cría. Los neonatos fueron marcados en el carapacho con el mismo código que sus huevos de origen y colocados en un contenedor para posteriormente ser liberadas en su playa de origen.

Finalmente, se identificó la etapa de desarrollo embrionario de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), de acuerdo con la descripción de Miller (1985) en base al uso de la ovoscopía y la disección, así se obtuvo un registro fotográfico para observar algunas características morfológicas que pudieran ayudar a su identificación tales como coloración, forma y tamaño de extremidades, carapacho, ojos, cola, entre otras. Los embriones diseccionados fueron fijados en formol 10 días y posteriormente se conservaron en alcohol al 70%.

9.2.2. *Analizar el ritmo cardíaco de los embriones durante 24 hrs para determinar si existe (a) un ciclo circadiano o (b) sincronización entre embriones del mismo nido o entre nidos.*

Se realizó una visita al campamento tortuguero El Verde Camacho con el doble fin de familiarizarnos y poner a punto el monitor *Buddy Mk2* para medir el ritmo cardíaco en los embriones de tortuga golfina, así como determinar si existe un ciclo circadiano entre los embriones del mismo nido o entre nidos diferentes adaptando la metodología de Loudon *et al.* (2013). Los nidos muestreados se seleccionaron de entre los que se incuban en este campamento tortuguero en cajas de poliestireno y se mantienen en condiciones de temperaturas semi-controladas pero no totalmente constantes.

Se eligieron cinco nidos de 37-38 días de incubación (de anidaciones del 7 y 8 de octubre, 2015) de los que se tomaron al azar tres huevos, los cuales fueron rotulados con número de huevo y número de nido para su identificación. Cada huevo fue analizado en el ovoscopio para observar y asegurarnos de la presencia de (1) un embrión viable, donde identificamos la etapa sexualmente diferenciada (SD) donde el cuerpo del embrión está pigmentado totalmente. Se tomó registro fotográfico y se procedió a realizar la medición del ritmo cardíaco cada minuto durante 4 minutos cada 6 horas (12 pm, 6 pm, 12 pm, 6 am) con el monitor (Loudon *et al.*, 2013) durante un ciclo de 24 horas. Al cabo de la medición se devolvió el huevo a su posición inicial en la caja de incubación.

La frecuencia cardíaca (latidos por minuto, LPM) se registró y se calculó el promedio para cada muestreo. Para análisis complementarios, se determinó también el diámetro y el peso del huevo, el tamaño de la madre (longitud curva del carapacho), la hora al inicio de cada medición, así como la temperatura superficial del huevo utilizando un termómetro IR (Fluke®) al inicio y finalización de cada registro.

9.2.3. *Comparar los patrones del ritmo cardíaco y el límite mortal superior de temperatura en embriones de diferentes nidos y en diferentes etapas de desarrollo expuestos a incrementos de temperatura.*

9.2.3.1. Incubación y selección de embriones

Se realizaron dos repeticiones de las pruebas experimentales de estrés térmico, una en marzo del 2016 y otra en el mes de agosto del mismo año. Para la incubación del mes de marzo 2015 se tomaron 20 huevos de cada uno de los tres nidos recolectados y para la réplica de agosto 2016 se colocaron 45 huevos provenientes de cada de los dos nidos en

dos incubadoras diferentes que se mantuvieron, una a temperatura promotora de machos (28°C) y otra promotora de hembras (32°C), mientras que la incubación de marzo sólo se manejó una sola temperatura (32°C) (Figura 15).

En ambas repeticiones los huevos se colocaron dentro de una capa de vermiculita humedecida en las incubadoras correspondientes con una capacidad de 90 litros. Cada día se rociaron los huevos con agua desionizada para reemplazar pérdidas normales de agua. Previo a la incubación, los huevos fueron pesados, medidos y rotulados.



Figura 15. Distribución de embriones de tortuga golfina en los sistemas de incubación.

9.2.3.2. Calibración de sensores de temperatura

Los sensores tienen una alta resolución y precisión especificada por el productor (MAXIM DS18B20 1-Wire Digital Thermometer). Sin embargo estos sensores comúnmente presentan una dispersión en sus mediciones (Figura 16A), por lo que se aplicó una calibración de las lecturas de temperatura, comparadas con las de un termómetro de Mercurio con certificación. La calibración de todos los sensores consistió en un valor de corrección del error de las lecturas medidas con respecto al del valor del termómetro certificado (Figura 16B), que fue ligeramente variable a diferentes temperaturas.

A



B

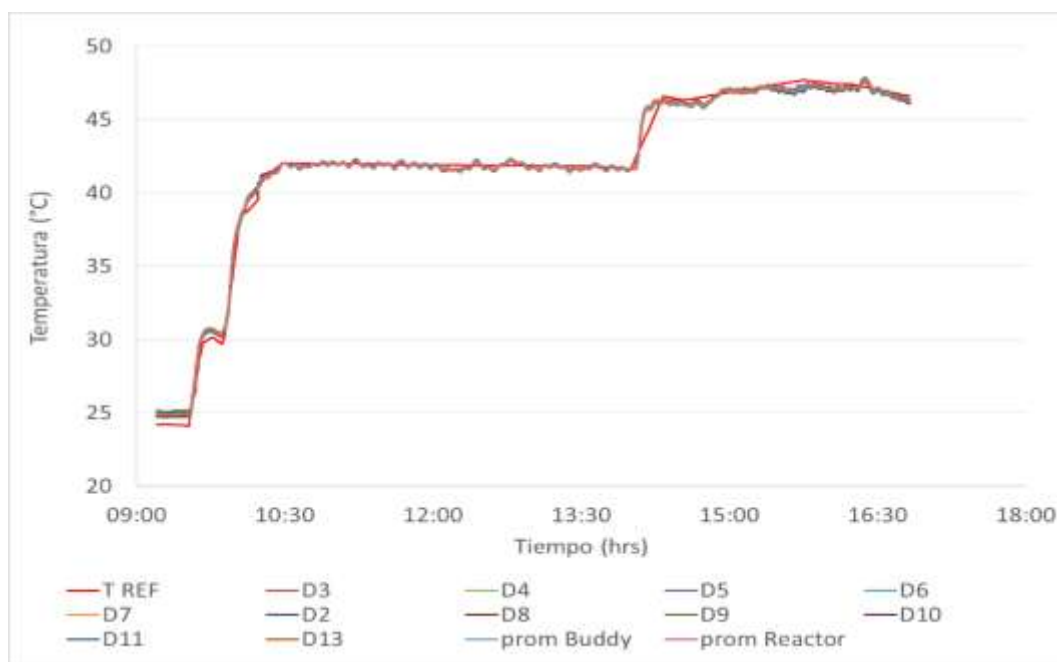


Figura 16. Calibración de conjunto de sensores de incubadoras experimentales. (A): La línea roja representa los valores de la temperatura de referencia medidos por el termómetro calibrado (T REF; las demás líneas son el conjunto de registros de los 11 sensores ocupados en las incubadoras. (B) Lecturas de sensores ajustados con factor de corrección junto con la temperatura de referencia (T REF).

9.2.3.3. Sistemas controlados por Arduino para la aplicación de calentamiento y registro de cambios de temperatura

Para adaptar la metodología de Angilletta *et al.* (2013) a nuestras condiciones, se aprovechó nuestra experiencia con el uso de sistemas de incubación controladas por tarjetas *Arduino*. En este caso, se utilizaron dos hieleras Coleman de 45 litros debido a que se usarían menos huevos, pero con el mismo concepto básico que las incubadoras de largo plazo (Figura 17). En la primera incubadora (denominada “Reactor”) se mantuvieron los huevos bajo un régimen de incremento constante de temperatura (1.5° C/hr) controlado por el programa. El ambiente mantuvo condiciones aptas (humedad y sustrato) para los huevos al colocarlos sobre una charola con una capa de vermiculita húmeda para evitar desecación de los mismos, suspendida sobre un armazón de PVC sobre el que se colocó un serpentín de calentador para reptilarios (*ZooMed Reptile Heat Cable* de 100W) así como ventiladores para garantizar homogenizar la temperatura. El régimen térmico se controló por *Arduino* que recibía y registraba cada 10 segundos la temperatura de 6 sensores metálicos calibrados y distribuidos para verificar la temperatura interna de la incubadora y de los huevos experimentales, y controlaba el voltaje del calentador. En la segunda hielera se colocó un sistema espejo con cinco sensores térmicos y programación de incrementos térmicos idéntica y sincrónica en donde se situó el monitor *Buddy* de ritmo cardíaco. Debido a que a esta incubadora estaríamos ingresando huevos para cada lectura y se requería acceso a la carátula del monitor del *Buddy*, se construyó una segunda tapa de poliestireno con una ranura en la que solo cupiera la carátula del aparato y evitara la pérdida de calor al interior (Figura 18).





Figura 17. Incubadora experimental "Reactor" con la plataforma para el sustrato y los huevos, además de los cables del calentador y sensores. Se programó para iniciar a 28° o 32°C y realizar incrementos graduales de temperatura a una tasa de 1.5°C/hr mediados por el sistema *Arduino*.

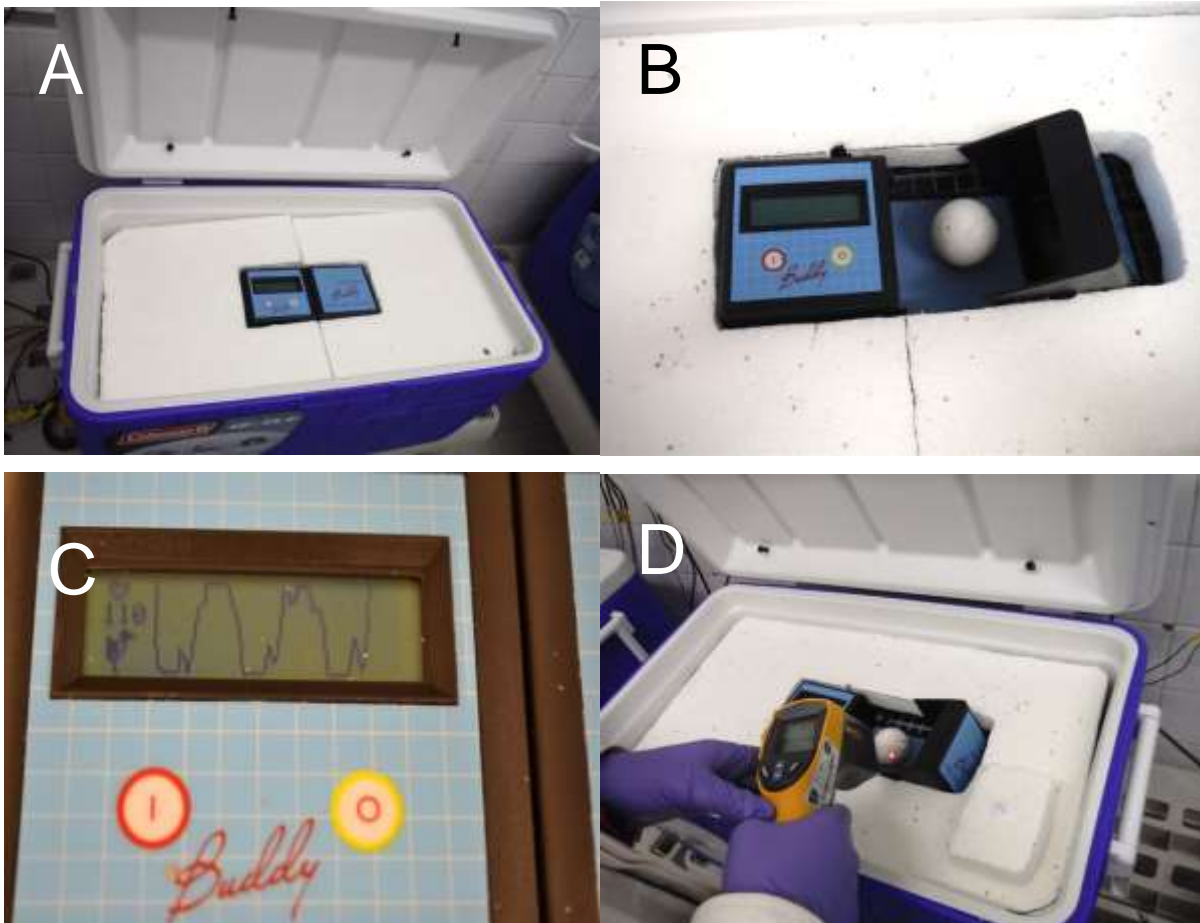


Figura 18. Incubadora "Buddy" con monitor de ritmo cardíaco, sincronizada para mantener temperaturas idénticas a las de la incubadora Reactor mediante el sistema *Arduino* (A); posición correcta del huevo sobre el monitor (B); frecuencia cardíaca registrada (C) y toma de temperatura superficial al huevo con termómetro IR (D).

9.2.3.4. Límites térmicos de la frecuencia cardíaca

Para determinar los límites térmicos se utilizaron embriones de ambas temperaturas de incubación con el fin de comparar la respuesta del comportamiento del ritmo cardíaco entre temperaturas y etapas de desarrollo. Se evaluaron cinco conjuntos distintos de embriones en los tres tercios de desarrollo uno en durante el 1er tercio (32°C), dos durante el 2do tercio (28° y 32°C) y dos durante el último tercio de desarrollo (28° y 32°C) (Tabla 9).

Para evaluar la tolerancia térmica se revisó que los estadios fueran los deseados mediante el uso de la ovoscopia según los criterios establecidos en objetivos anteriores. Brevemente, para el 1er tercio el ojo comienza la pigmentación, para el 2do tercio los ojos están totalmente pigmentados, el carapacho inicia una pigmentación mientras que el cuello y la cabeza permanecen sin coloración. En el último tercio del desarrollo toda la cabeza, el cuello y el dorso del carapacho están completamente pigmentados. Adicionalmente, la ovoscopia permitió verificar que los huevos por utilizar contenían embriones viables lo cual de otra manera no sería factible.

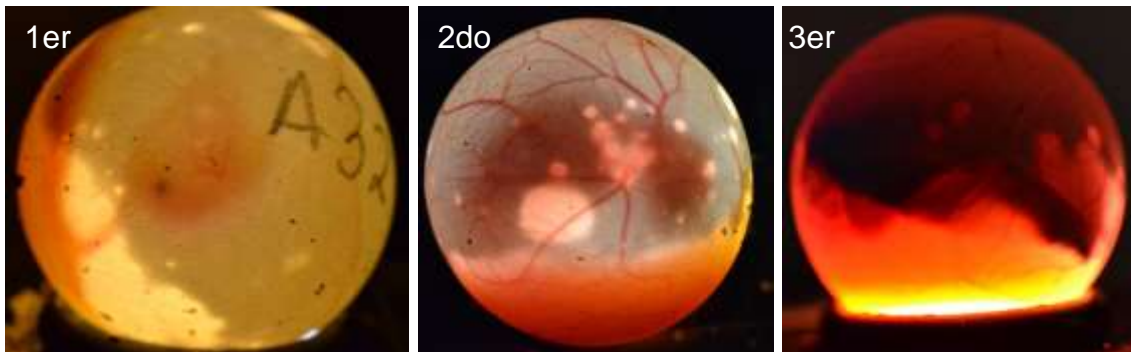


Figura 19. Rasgos usados para seleccionar embriones para experimentación. Embrión con ojo pigmentado en 1er tercio, embrión con ojo y carapacho pigmentado en 2do tercio y embrión con cabeza, cuello y dorso pigmentados en 3er tercio del desarrollo.

Para la evaluación del ritmo cardíaco por huevo cuando se alcanzaba el incremento de temperatura programado se trasladaba un huevo cada vez de la primera incubadora a la segunda para leer el ritmo cardíaco (a la misma temperatura) y acabando la lectura se regresaba a la primera incubadora. Luego se tomaba el siguiente huevo para repetir la rutina, y así sucesivamente hasta terminar con todos los huevos del juego y esperar la siguiente ronda de lecturas. Esta ocurría, cuando la temperatura aumentaba un grado centígrado, tomando embriones uno a uno y asegurando que las evaluaciones logaran un valor estable, y que no tardaran más de 3 minutos cada uno. De esta manera se podía

proceder de manera constante a lecturas escalonadas de cada huevo para cada ciclo de incrementos de 1°C cada uno, en una operación rápida que evitaban cambios de temperatura fuera de los programados. Para cada huevo las evaluaciones se llevaban a cabo durante todo el proceso de aumentos de temperatura y se terminaban cuando su ritmo cardíaco se tornaba cero en dos intervalos sucesivos. Al inicio y final de cada evaluación, se midió la temperatura superficial de cada huevo con ayuda del termómetro de luz IR (Figura 18).

Este protocolo se diseñó para lograr una eficiente evaluación de un conjunto de huevos a la vez (dos primeramente y de allí en adelante seis a la vez) en vez de uno por uno como en Angilletta *et al.* (2013) que implica una experimentación prolongada cuando se requiere evaluar decenas de huevos. Todos los experimentos se iniciaron a una misma hora del día cuando se alcanzaban las fases de desarrollo a muestrear y las pruebas experimentales se realizaron a partir de las temperaturas de origen de la incubación, ya sea embriones provenientes de 28° o 32°C.

Los huevos de los grupos control se mantuvieron en su temperatura de incubación constante (32°C) pero para controlar el efecto del procedimiento, fueron trasladados durante los mismos tiempos para simular la manipulación, pero sin calentamiento. Al final de cada evaluación de ritmo cardíaco se pesaron los huevos para estimar la pérdida de humedad durante la experimentación.

9.2.4. Análisis estadístico

Para la fase lineal del comportamiento del ritmo cardíaco se ajustaron modelos lineales y lineales mixtos utilizando combinaciones de variables explicativas para luego identificar el modelo más probable para confirmar el mejor ajuste sobre la base del criterio informativo de Akaike (AIC), eliminando los términos por orden del mayor al menor hasta que se obtuvo el modelo con el criterio AIC más bajo y se aprovechó mediante el comando `bbmle::AICtab` de la librería `bbmle` en el ambiente estadístico *R*. Estos modelos fueron utilizados posteriormente para indagar sobre la influencia de los distintos factores sobre el desempeño cardíaco y para graficar una selección de regresiones para fines ilustrativos. Asimismo, se derivaron regresiones lineales para determinar los valores de las pendientes, las intersecciones y sus errores estándar correspondientes con los cuales realizar análisis complementario. Para evitar la pseudoreplicación, también se incluyó la identidad de cada huevo como un factor aleatorio (Zuur *et al.*, 2009).

Se obtuvieron los valores de intersección y pendiente para cada una de las regresiones lineales, así como el valor de P o significancia y R^2 . Asimismo, se obtuvieron los intervalos de confianza al 2.5% y al 97.5% de las intersecciones y las pendientes. Para visualizar el efecto de las variables explicativas con el mejor ajuste que mostró el modelo sobre el ritmo cardíaco, se construyeron gráficas usando librerías de *ggplot2* y *plyr*, separándolas por variable categórica (*TempInc*, *Etapa*, *Nido* y *Repeticion*).

Se extrapolaron los valores de las regresiones de la fase lineal para calcular el análogo del coeficiente de temperatura Q_{10} .

El coeficiente Q_{10} se calculó de la siguiente manera:

$$Q_{10} = (R_1/R_2)^{10 / (T_2-T_1)}$$

Donde:

R es la tasa de cambio

T es la temperatura en grados Celsius o Kelvin

Para el análisis de la fase completa de los resultados se conjuntaron los datos de agosto y marzo y se aplicaron modelos generalizados aditivos (*gam*) con las rutinas **blme** dentro de la librería **mgcv** del paquete estadístico R (Versión 3.3.2). Debido a que la respuesta en el transcurso completo del experimento es compleja no puede ser abordada por modelos lineales para lo cual se ajustaron modelos para identificar cual es el más informativo a utilizar sobre el criterio informativo de Akaike (AIC) que describió los valores de ritmo cardíaco en función de la temperatura y de variables explicativas que incluyeron *Etapa*, *Temperatura de incubación*, *Nido* y *Repetición*.

Además se realizaron diferentes modelos integrando un factor de interacción entre las diferentes variables para identificar cuáles son las que contribuyen significativamente a la respuesta del ritmo cardíaco. Se construyeron gráficas usando librerías de *ggplot2* en el ambiente R para visualizar los efectos de las variables explicativas de los diferentes modelos.

Dado que los modelos lineales no fueron capaces de ajustarse a la fuerte caída de la frecuencia cardíaca a altas temperaturas, se utilizaron los datos brutos para estimar los límites térmicos del rendimiento cardíaco, es decir la temperatura a la cual se alcanza el máximo ritmo cardíaco y la temperatura a la cual se da el paro cardíaco. Las gráficas se modelaron con las librerías *MASS*, *mgcv*, *splines* y *ggplot2* dentro del paquete estadístico R (Versión 3.3.2).

10.RESULTADOS

10.1. Validación del ovoscopio para detectar rasgos morfológicos de referencia en el embrión

El ovoscopio permitió realizar observaciones no invasivas de los embriones con el propósito de (1) verificar la viabilidad del organismo e (2) identificar, en lo posible, las diferentes etapas del desarrollo, se llevó a cabo un experimento preliminar para determinar la capacidad del instrumento para lograr estos objetivos, comparando fotografías obtenidas con el ovoscopio y otras del mismo espécimen directamente pero posterior a la disección.

Los resultados que aquí se describen indican que si bien no es posible identificar todos los rasgos morfológicos del embrión que serían necesarios para el seguimiento de cada una de las etapas de su proceso de desarrollo, por medio del uso del aparato si fue factible identificar características de utilidad para detectar las etapas de importancia para las necesidades de este proyecto.



Figura 20. Visualización de condición del embrión en huevos de tortuga golfina por medio del ovoscopio.

Por ejemplo, se encontró que había varias características muy notables que permiten distinguir embriones muertos de los que permanecen viables. Los huevos con embriones muertos no son siempre evidentes a partir de observaciones externas del mismo. Sin embargo (Figura 20), con el ovoscopio fue muy sencilla su identificación ya que el huevo aparece traslúcido sin estructuras aparentes. A veces, se puede observar solamente restos de la yema. En contraste, en huevos con embriones vivos, una vascularización amplia y bien formada es evidente y una señal confiable de la continuada viabilidad del organismo. Un proceso de muerte embrionaria parece comenzar con la degradación de los vasos sanguíneos hasta perderlos completamente y paralelamente se va desintegrando el

embrión, hasta llegar a un contenido traslúcido. Con excepción de detalles en la desintegración del embrión, todo este proceso es visible con el ovoscopio.

A pesar de que hay otras fases que podrían ser identificables con el ovoscopio, éste permitió distinguir cambios en rasgos morfológicos asociados con las fases de nuestro interés (1er, 2do y 3er tercio). Afortunadamente estas fases están asociadas a cambios en el nivel de pigmentación en partes del cuerpo que son observables a contra-luz con el ovoscopio.

Los rasgos más visibles en el ovoscopio son aquellos asociados con modificaciones mayores en las extremidades o con el grado de pigmentación en partes específicas del cuerpo del embrión. Por ejemplo, entre la etapa 17-19 se inicia la pigmentación del ojo lo cual fue perfectamente identificable en nuestras incubaciones (alrededor de los 14 días de incubación a 28°C; Tabla 5). En esta etapa aún no se extiende la vascularización pero el perfil del embrión es claro y esto ya nos permitió reconocer que el embrión estaba formándose correctamente.

El periodo termosensible (PTS) ocurre en la etapa 24 en incubaciones de 26°C y en la 25 a 33°C (Merchant-Larios *et al.*, 2010), mientras que la etapa sexualmente diferenciada (SD) posterior a la etapa 25 en la menor temperatura y de la 26 en la mayor. La morfología de crías de tortuga golfinia es ilustrada en fotografías en Merchant-Larios *et al.* (1997) que nos sirvieron como base para nuestra clasificación a partir de los rasgos morfológicos asociados con estas dos fases. En el PTS, independientemente de la temperatura de incubación, los embriones aparecen con un cuerpo generalmente pálido, ojo grande y pigmentado, y las líneas de los escudos apenas visibles con incipiente pigmentación. No obstante, el PTS ocurre más rápido a mayores temperaturas.

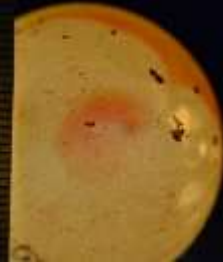



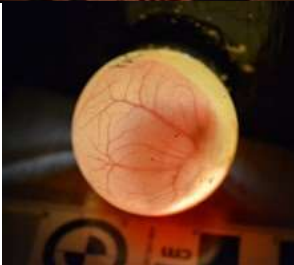

En nuestro caso, los rasgos característicos del PTS aparecieron entre los días 20-24 en la incubación a 32°C y entre los días 28-35 a una temperatura de 28°C (Tabla 5). La pigmentación en el carapacho no es muy aparente en el ovoscopio (particularmente al inicio del PTS), pero si se puede distinguir esta fase por el tamaño del embrión, la fuerte pigmentación del ojo y en los últimos días del PTS si se percibe la pigmentación en el carapacho (Tabla 5). En base a estos resultados, consideramos prudente, para muestreos de embriones en PTS, el esperar a que sea aún más evidente la pigmentación en el carapacho (antes de que se pigmente la cabeza) para asegurar la identificación del punto de muestreo. Para incubaciones a 28° y 32°C, esto sería alrededor de 28 y 20 días, respectivamente. Estos períodos coinciden bien con lo descrito por Merchant-Larios *et al.* (1997) a pesar de usar temperaturas ligeramente distintas y refleja que a una menor

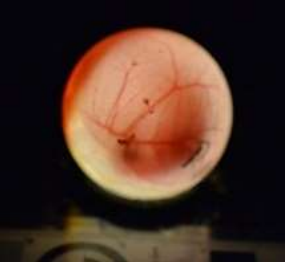







temperatura el desarrollo de los embriones es más lento que el desarrollo de embriones incubándose a una mayor temperatura y por tanto alcanzan después el periodo termosensible.

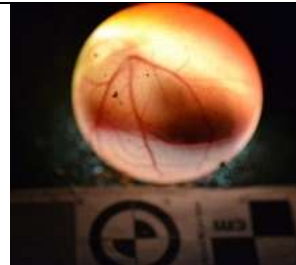



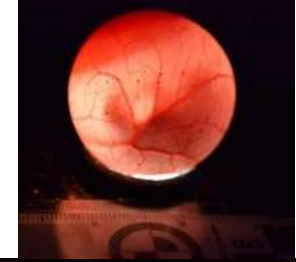



También fue sencillo identificar el inicio de la etapa sexualmente determinada, donde el cuerpo del embrión adquiere pigmentación en la cabeza, el cuello, las aletas y en el carapacho. Al inicio el plastrón posee una coloración más pálida (Tabla 5). Para embriones de 28°C, la etapa SD aparece en la etapa 27-29 entre los días 42-56 y a una temperatura de 32°C aparece en la etapa 27-28 del desarrollo embrionario entre los días 28-35 de incubación. Las disecciones de los organismos permitieron verificar con certeza las características primordiales e identificar su etapa de desarrollo de acuerdo a la clasificación de Miller (1985).




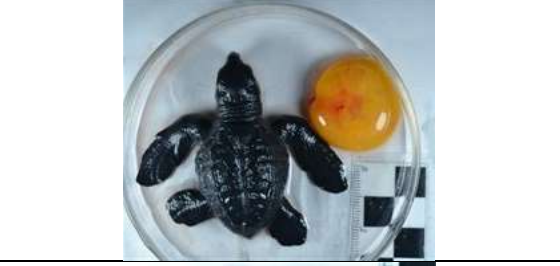




Rumbo al final del desarrollo embrionario de la tortuga golfina, en la etapa 29 (Tabla 5), donde el embrión está casi listo para eclosionar, se observó que el cuerpo se ha pigmentado por completo y el vitelo ocupa una menor proporción del volumen total del huevo. Así, para la etapa 30 eclosionaron crías cuyo vitelo muy reducido fue absorbido completamente en el transcurso de los siguientes 3 días, momento cuando fueron liberadas en su playa de origen.

Tabla 5. Validación de ovoscopia para la identificación de etapas clave en el desarrollo embrionario en tortuga golfina.

Día	Temp	Etapas	Rasgos notables	Embriones por ovoscopia	Dissección del embrión	No. Huevo/Nido
14	28°	19	Pigmentación del ojo (etapa 17-19)			B9/N7
20	32°	24/2do tercio	Ojos pigmentados, carapacho inicia pigmentación (Periodo Termosensible)			A50/N6
28	28°	25/2do tercio	Ojos pigmentados, carapacho inicia pigmentación (Periodo Termosensible)			B24/N6

28	28°	25/2do tercio	Ojos pigmentados, carapacho inicia pigmentación (Periodo Termosensible)			B14/N7
24	32°	26/2do tercio	Ojos pigmentados, carapacho inicia pigmentación (Periodo Termosensible)			A6/N7
35	28°	27/2do tercio	Ojos pigmentados, carapacho inicia pigmentación (Periodo Termosensible)			B34/N6
35	28°	27/2do tercio	Ojos pigmentados, carapacho inicia pigmentación (Periodo Termosensible)			B4/N7

24	32°	26/2do tercio	Ojos pigmentados, carapacho inicia pigmentación (Periodo Termosensible)			A49/N6
28	32°	27/3er tercio	Cuerpo comienza a pigmentarse dorsalmente, el plastrón es pálido (Inicio de 3er tercio)			A14/N7
28	32°	27/3er tercio	Ojos, cabeza, cuello, aletas y la parte dorsal del carapacho pigmentados (Inicio de Etapa Sexualmente determinado)			A24/N6
33	32°	27/3er tercio	Ojos, cabeza, cuello, aletas y la parte dorsal del carapacho pigmentados (Etapa Sexualmente determinado)			A34/N6

28	32°	27/3er tercio	Ojos, cabeza, cuello, aletas y la parte dorsal del carapacho pigmentados (Etapa Sexualmente determinado)			A14/N7
35	32°	28/3er tercio	Ojos, cabeza, cuello, aletas y la parte dorsal del carapacho pigmentados (Etapa Sexualmente determinado)			A46/N6
42	28°	29/3er tercio	Ojos, cabeza, cuello, aletas y la parte dorsal del carapacho pigmentados (Etapa Sexualmente determinado)			B54/N6
56	28°	29/3er tercio	Cuerpo tamaño de cría y totalmente pigmentado (Etapa final antes de rasgar el cascarón).			B29/N7

A continuación, se describen los resultados del proyecto enfocados a los objetivos específicos.

10.2. Aproximación de las etapas del desarrollo cardíaco en tortuga golfina

En secciones posteriores de este capítulo se presentan resultados de los análisis del ritmo cardíaco para varias etapas de desarrollo embrionario para nuestra especie objetivo. Las etapas muestreadas se seleccionaron sobre la base de rasgos morfológicos y un porcentaje del desarrollo completo. Sin embargo, también es útil y probablemente informativo para la interpretación de nuestros resultados el conocer el nivel de desarrollo que ocurre de manera paralela en el corazón mismo. Desgraciadamente no existe un estudio para tortuga golfina del desarrollo cardíaco y la identificación de las etapas de este proceso en los embriones experimentales rebasa los alcances del presente trabajo. No obstante, es posible realizar una aproximación de esta información para nuestra especie con apoyo de diversos trabajos en la literatura que describen el desarrollo del corazón en algunas tortugas (revisado en el capítulo 1.3) siempre y cuando se pueda corresponder con etapas de desarrollo morfológico análogas a las que atraviesan los embriones de la tortuga golfina.

La identificación de etapas de desarrollo embrionario para nuestros especímenes se basó en el trabajo de Miller (1985) que incluye varias especies de quelonios. En esta sección y para los fines anteriormente expresados, se incluye también la de Crastz (1982) para golfina y se compara con las clasificaciones de Yntema (1968) para *Chelydra serpentina* y la de Greenbaum (2002) con *Trachemys scripta* debido a que son las que se han usado para la clasificación de referencia en los estudios del desarrollo cardíaco en tortugas.

Durante las pruebas de tolerancia térmica se muestrearon embriones del punto medio del primer, segundo y último tercio del período de incubación, donde los embriones manifiestan cambios morfológicos diagnósticos verificados por ovoscopía y observaciones post-mortem (Tabla 8). Utilizando los rasgos morfológicos como referencia, podemos corresponderlos con las etapas 21, 24 y 28 de Miller (1985) (Tabla 7) que son análogas a las etapas 14-15, 17-18 y 21 de *Chelydra serpentina* (según Yntema, 1968) y de *Trachemys scripta* (según Greenbaum, 2002) (Tabla 6 y Tabla 7).

Tabla 6. Correspondencia entre etapas del desarrollo embrionario en especies de tortugas dulceacuícolas y tortugas marinas.

FASES MUESTREADAS	<i>Chelydra serpentina</i> (Yntema, 1968)	<i>Trachemys scripta</i> (Greenbaum, 2002)	Tortugas marinas (Miller, 1985)	<i>Lepidochelys olivacea</i> (Crastz, 1982)
1er tercio	14-15	15	21	13-14
2do tercio	17-18	18	24	17-18
3er tercio	21	21	28	26-28

A nivel del desarrollo cardíaco, las fases de cambio más notables son cuatro de acuerdo con Koshiba-Takeuchi *et al.* (2009) que ocurren en las etapas 12, 14, 17 y 21 en la tortuga *Trachemys scripta* (ver capítulo 1.3). Podemos suponer que este proceso es análogo en tortuga golfina aunque cabe resaltar que nosotros no realizamos pruebas de tolerancia térmica en etapas tempranas o equivalentes de la etapa 12 debido a que el corazón es demasiado sensible y su lectura es errática en los aparatos usados. Pero el resto debería haber ocurrido de manera análoga.

En la fase de desarrollo embrionario que corresponde con el **primer tercio** en nuestros especímenes (equivalente a la etapa 14 en *Trachemys scripta*) Bertens *et al.* (2010) describieron la presencia de dos cámaras incipientes en el corazón, un atrio y un ventrículo (Tabla 8) los cuales no están septados o divididos por un tabique.

Para la etapa 17 de Bertens *et al.* (2010), que sería equivalente al **segundo tercio** en nuestros experimentos, ocurre la septación cardíaca y el corazón de la tortuga ya es un órgano completo que posee tres cámaras: dos atrios y un ventrículo (Tabla 8). Es decir, el corazón ya es un órgano totalmente formado según lo registran en la literatura.

En la etapa 21 (Bertens *et al.*, 2010), equivalente al **tercer tercio** de nuestros especímenes, aparece una estructura similar a un *septum* interventricular, pero permanece incompleto y el corazón sigue teniendo tres cámaras (Tabla 8, flecha roja). No obstante, ya para esta fase el corazón es mucho más robusto y el embrión ya tiene una mejor capacidad de regular el bombeo de sangre.

Tabla 7. Etapas de desarrollo embrionario en tortugas marinas (Miller, 1985) análogas a las de Yntema (1968) para *Chelydra serpentina*, y las de Greenbaum (2002) para *Trachemys scripta*.





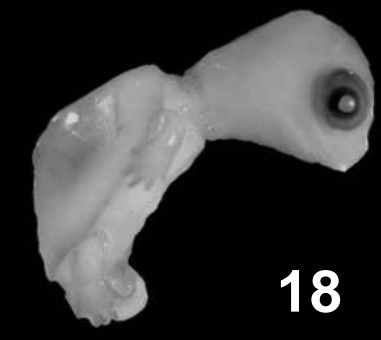

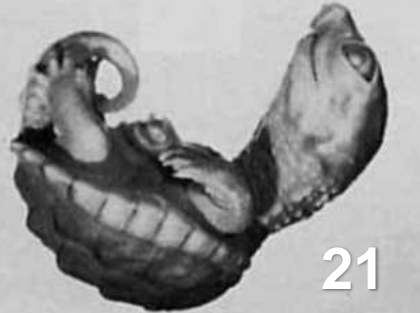
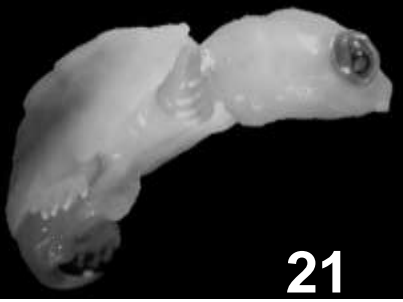
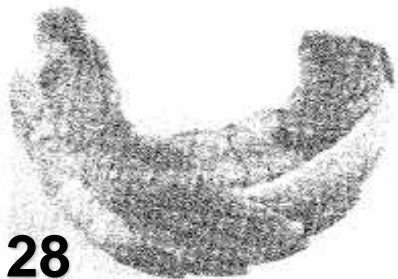
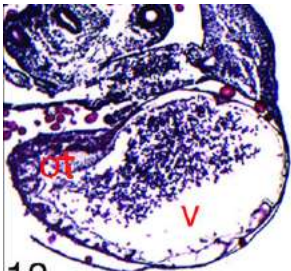

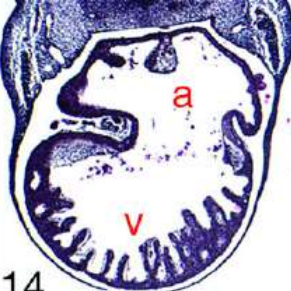

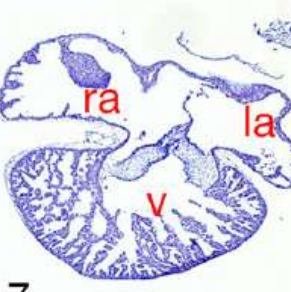



Etapas en <i>Chelydra serpentina</i> (Yntema, 1968)	Etapas en <i>Trachemys scripta</i> (Greenbaum, 2002)	Etapas en <i>Chelonia mydas</i> comparables en <i>L. olivacea</i> (Miller, 1985)	Rasgos más sobresalientes en las etapas muestreadas en este estudio
 <p>14</p>	 <p>15</p>	 <p>21</p>	<p>1er tercio. Los radios del iris son evidentes e inicia la pigmentación. Las placas digitales se asemejan a unos remos. La vena anterior corre ventralmente desde la region umbilical. El <i>septum primum</i> se ha extendido hasta la mitad de la longitud de la aurícula.</p>
 <p>17</p>	 <p>18</p>	 <p>24</p>	<p>2do tercio. El iris está totalmente pigmentado. Se produce pigmentación a lo largo de los escudos centrales y laterales .en el caparazón, cuello y cabeza permanecen sin coloración. Las extremidades anteriores se extienden más de la mitad del borde posterior del área inframarginal. Inicia la aparición del septo interventricular en el corazón.</p>
 <p>21</p>	 <p>21</p>	 <p>28</p>	<p>3er tercio. La pigmentación del caparazón, plastrón y escamas en general se intensifica pero es más ligera que el de una cría. El pliegue transversal del plastrón se compone de los escudos abdominales y los escudos inframarginales en una depresión.</p>

Tabla 8. Correspondencias de las cuatro etapas del desarrollo cardíaco en embriones de tortugas extrapoladas para la especie en nuestro estudio sobre la base de las analogías en el desarrollo morfológico entre especies (ver capítulo 1.3).

Periodo	Etapa y grado de desarrollo de corazón en <i>Trachemys scripta</i> (Koshiba-Takeuchi <i>et al.</i> , 2009).	Observaciones de este estudio (etapas clasificadas de acuerdo a Miller (1985)	Rasgos sobresalientes
Etapa temprana	 <p>12</p>	 <p>*embrión visto en ovoscopio (día 8 incubado a 28°C)</p>	<p>Corazón: Su formación apenas comienza con la aparición de vasos sanguíneos y venas vitelinas. El tejido se acomoda para la formación de las cavidades.</p> <p>Cuerpo: En ovoscopio, el embrión se observa como un disco y en su interior un pequeño tubo en donde los pliegues neurales comienzan a desarrollarse (no se pudo obtener disección del embrión en esta etapa).</p>
1er tercio	 <p>14</p>	 <p>21</p>	<p>Corazón: Ya posee dos cavidades, un atrio y un ventrículo pero sin septación.</p> <p>Cuerpo: El ojo está totalmente pigmentado mientras que el resto del cuerpo permanece sin coloración. Las extremidades tienen apariencia de remo.</p>
2do tercio	 <p>17</p>	 <p>24</p>	<p>Corazón: Ocurre la septación cardíaca, por tanto se separa el atrio izquierdo del derecho y ya se observa un ventrículo bien definido.</p> <p>Cuerpo: se observa pigmentación en el caparazón, ojos, y cuello.</p>
3er tercio	 <p>21</p>	 <p>28</p>	<p>Corazón: es un órgano bien conformado con sus 3 cámaras y aparece un septo interventricular dividiendo parcialmente al ventrículo.</p> <p>Cuerpo: la pigmentación ha aumentado en todo el cuerpo tanto aletas y plastrón.</p>

*Abreviaturas: **a**=atrio, **la**=atrio izquierdo, **lv**=ventrículo izquierdo, **ot**= tracto de salida, **ra**=atrio derecho, **rv**=ventrículo derecho, **v**=ventrículo, **flecha**= septo interventricular.

10.3. Efecto de diferentes nidos y dos temperaturas (28° y 32°C) sobre la tasa de crecimiento de embriones

10.3.1. Análisis del crecimiento embrionario

Los muestreos y disección de embriones en diferentes etapas de desarrollo en las incubaciones a dos temperaturas contrastantes (28° y 32°C) permitieron analizar con detalle el efecto de la temperatura y nido sobre el crecimiento embrionario en tortuga golfinia. A continuación se describen los patrones de crecimiento derivados de distintas mediciones.

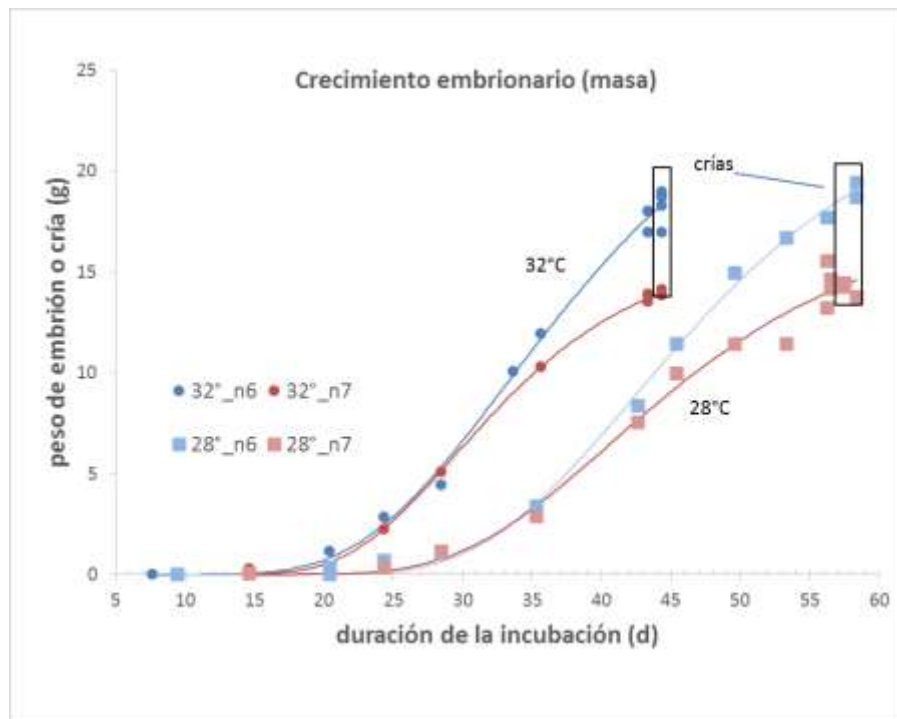


Figura 21. Crecimiento embrionario con ganancia de peso respecto al tiempo de incubación.

10.3.2. Tasa de crecimiento embrionario: masa

El aumento en peso de los embriones conforme la duración de la incubación tiene una tendencia clara y precisa a aumentar en ambos nidos y en las diferentes temperaturas manejadas. Sin embargo, a partir de los 20 días de incubación es notorio que a diferente temperatura se separa esta tendencia y que a temperatura de 32°C es más rápido el aumento de peso conforme al tiempo de incubación, mientras que a una temperatura de 28°C ya que se alarga el período de desarrollo y la tasa es más lenta.

El patrón en el aumento en peso de embriones provenientes de nidos distintos e incubados bajo una misma temperatura, es marcadamente diferente. Dentro de una temperatura de 32°C ambos nidos mantienen juntos una tendencia a favor de la ganancia de peso, sin embargo, alrededor de los 30 y 35 días de incubación, cuando se observa una separación en las tendencias, con el nido 6 manifestando una velocidad mucho mayor que la del nido 7 que se mantiene aún en diferentes pesos de las crías resultantes.

Asimismo, el aumento de peso a una temperatura de 28°C se comporta de manera similar entre nidos, con las crías provenientes del nido 7 registrando menores pesos a lo largo del período embrionario e incluso posterior a la eclosión (Figura 21).

En este experimento no se registraron diferencias aparentes en los pesos de las crías de mismos nidos incubados a las dos temperaturas. Sin embargo, probablemente se requiera un mayor tamaño de muestra para detectarlas.

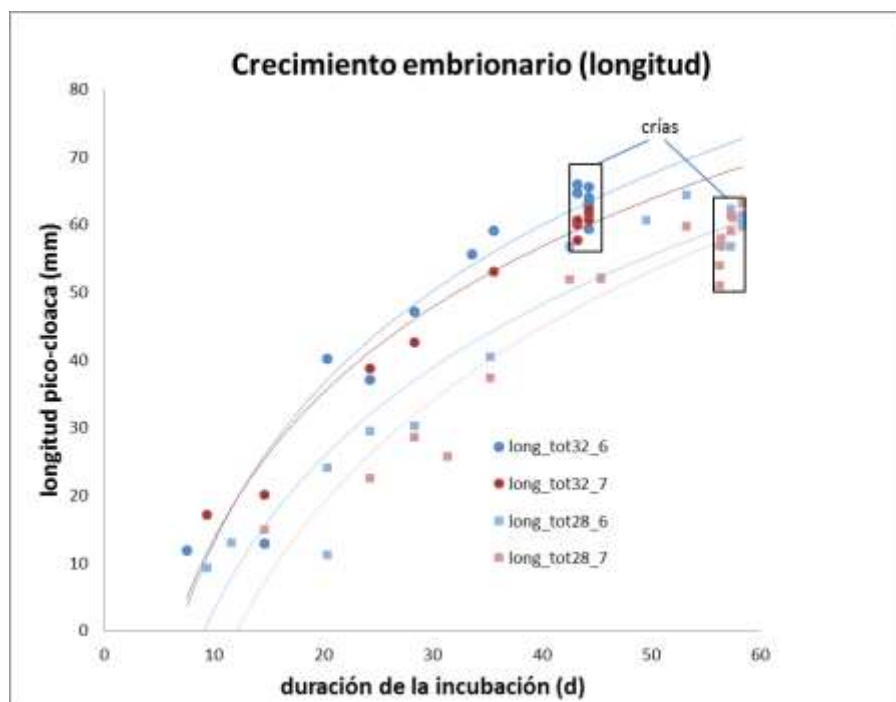


Figura 22. Crecimiento embrionario en cuanto a longitud pico-cloaca respecto al tiempo de incubación.

10.3.2.1. Tasa de crecimiento embrionario: longitud pico-cloaca

Para el caso del aumento en la longitud (medida del pico hasta la cloaca), se observa de nuevo menores tasas de crecimiento en 28°C que a 32°C (Figura 22). Similar a las medidas del peso, se encontraron mayores tasas de crecimiento para embriones del nido 6 que del

7, aunque las diferencias no son tan marcadas. Más aun, en las crías la diferencia de longitudes entre individuos de diferentes nidos, los valores son muy similares. Las longitudes de las crías de diferentes temperaturas de incubación no son marcadamente distintas aunque son ligeramente más cortas las de 28°C.

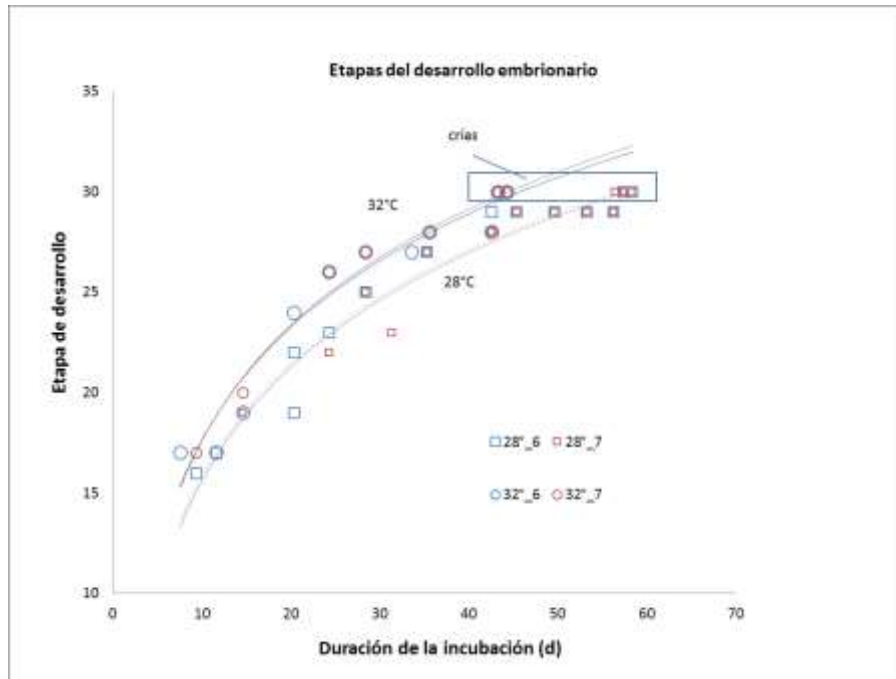


Figura 23. Identificación de etapas durante el desarrollo embrionario respecto al tiempo de incubación.

10.3.2.2. Tasa de crecimiento embrionario: etapa de desarrollo

El registro de las etapas de desarrollo embrionario de manera paralela a las mediciones de las tasas de crecimiento nos permitió determinar si las marcadas diferencias entre nidos para crecimiento se reflejan también en diferentes velocidades de cambio entre etapas.

Si bien la velocidad del desarrollo entre etapas fue mayor en las incubaciones de 32°C que en las de 28°, como era de esperarse, en general las etapas observadas para embriones de los dos nidos muestreados en un mismo día tendieron a ser las mismas, a pesar de que manifestaron tasas de incremento en peso o en talla muy contrastantes (Figura 23). Esto sugiere que las tasas de crecimiento corporal no necesariamente provocan saltos entre etapas de manera concomitante, sino que el cambio de etapas obedece a otros factores del desarrollo que definen cuándo debe ocurrir y de manera sincrónica. Congruente con esto, a pesar de las diferentes tasas de crecimiento corporal,

crías de ambos nidos eclosionan sincrónicamente en términos de días y en la etapa 30 de acuerdo con Miller (1985).

Una de las conclusiones que se derivan de estos experimentos preliminares es que la influencia del nido de origen ejerce un fuerte efecto sobre la dinámica del desarrollo embrionario, incluso opacando la influencia de la temperatura. Suponiendo que diferencias en tasas de crecimiento entre embriones de distintos nidos refleja diferencias en procesos metabólicos diversos, estos resultados apoyaron y justificaron tanto la realización de estos estudios previos, así como la inclusión del tratamiento nido en los objetivos principales relacionados con el análisis de tolerancia térmica. Asimismo, tomando en cuenta que se observó una correlación entre el tamaño de los huevos (diámetro y peso, datos no incluidos) y la dinámica de crecimiento observada se agregó una de nuestras hipótesis, específicamente aquella que espera que el nido de origen tenga un efecto sobre la respuesta de embriones al estrés térmico. Adicionalmente, dado que los embriones provenientes de los huevos de mayor tamaño fueron los que crecieron más rápido, entonces se podría hipotetizar que embriones provenientes de los huevos más grandes tendrán una mejor capacidad para tolerar estrés térmico.

10.4. Ritmo cardíaco de los embriones durante 24 hrs para determinar si existe (a) un ciclo circadiano y (b) sincronización entre embriones del mismo nido o entre nidos.

Para este análisis primeramente se realizaron observaciones con ovoscopia para seleccionar huevos con embriones viables y con rasgos morfológicos consistentes con la etapa sexualmente diferenciada. En la sala de incubación del campamento no se tiene un control completo de la temperatura, pero gracias a consistir en un cuarto cerrado y mantener los huevos enterrados bajo arena dentro de hieleras de poliestireno, la temperatura de incubación oscila alrededor de los 30°C de acuerdo a los registros térmicos del mismo campamento. Se seleccionaron varios nidos y se identificó que nidos con 37-38 días de incubación eran los que contenían embriones con las características deseadas y con fechas de anidación de 7/10/2015 y 8/10/2015 se procedió al muestreo. El primer muestreo inició a las 12 del primer día, para continuar a las 18 y 24 horas, terminando el ciclo de 24 horas a las 6am del siguiente día. Se decidió realizar dos muestreos más a las 12pm y a las 2pm de ese último día en los dos primeros nidos para verificar la temporalidad de la variación. En las gráficas los tiempos de muestreo se denotan por la hora del día o por la serie 12, 18,

24, 30, 36 y 38, donde los muestreos de 30, 36 y 38 horas corresponden a los muestreos a las 6, 12 y 14 horas del último día.

Con el monitor *Buddy* se midió el ritmo cardíaco cada 6 horas durante 24 hrs para determinar si existe un ciclo circadiano o una posible sincronización entre los distintos huevos muestreados de un mismo nido o entre diferentes nidos. En la visita al campamento tortuguero también pudimos familiarizarnos con el instrumento para uso en huevos de nidos de playa, que tienden a ser más pequeños y menos regulares en su morfología, en comparación de los que se obtienen en condiciones controladas de laboratorio. Supusimos que de ser capaces de registrar ritmo cardíaco en huevos con estas características, sería más factible hacerlo en huevos de laboratorio, aparentemente con condición más robusta. La experiencia adquirida con el uso del monitor *Buddy* nos permitió detectar la correcta posición del huevo para una medición confiable del ritmo cardíaco y así evitar variaciones en las lecturas para pruebas posteriores.

Los resultados que a continuación se describen confirman la capacidad del instrumento para identificar el ritmo cardíaco lo que servirá como fundamento para realizar las observaciones fisiológicas no-invasivas de embriones bajo las condiciones experimentales requeridas para este proyecto.

10.4.1. Ritmo cardíaco por huevo

Los valores de ritmo cardíaco en los muestreos repetidos en el mismo huevo se mantuvieron generalmente estables, con diferencias promedio de 6.4 latidos por minuto (LPM) entre los valores máximos y mínimos. Sin embargo, los registros del promedio de LPM para huevos en los cinco nidos diferentes manifestaron valores muy variables entre huevos y entre nidos (Figura 24) que difícilmente se podría interpretar como ciclos circadianos. Lo más probable es que si bien existen variaciones en los ritmos, estos sean irregulares y obedezcan factores desconocidos, intrínsecos y ambientales.

No obstante, se observan diferencias en las variaciones entre muestreos en algunos huevos. Por ejemplo, el huevo B1 mostró mucho menos variación que los demás, mientras que las variaciones del huevo B2 fueron las más grandes.

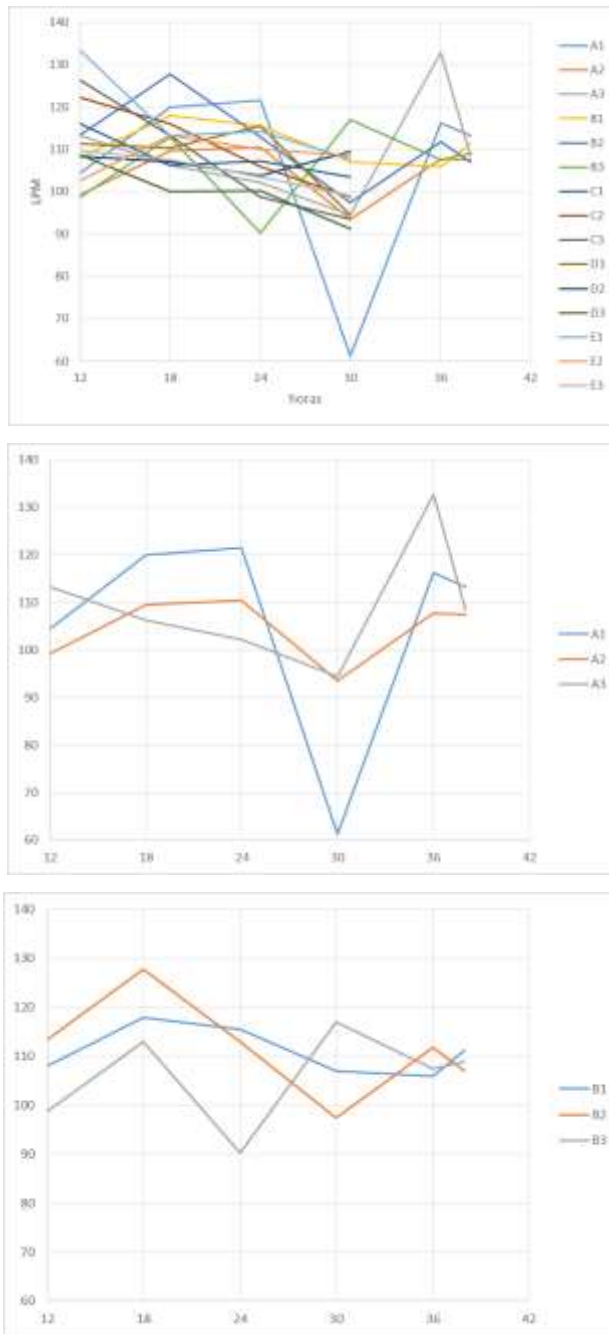


Figura 24. Ritmo cardíaco (promedio de 4 lecturas en 4 minutos) de huevos (1-5) de 5 nidos (A-E) muestreados cada 6 horas durante un ciclo de 24 horas. Los nidos A y B también fueron muestreados a 6 y 2 hrs posterior al ciclo de 24h.

10.4.2. Ritmo cardíaco por nido

A pesar de la magnitud de las diferencias entre huevos en mismos nidos rebasan en general las variaciones entre nidos, se promediaron los valores para cada nido con el fin de simplificar la observación de las tendencias a lo largo del muestreo de 24 horas y las 8 horas adicionales. Estos resultados de nuevo reflejan una gran variabilidad aún entre nidos, pero se nota una tendencia de reducción en los ritmos entre las 12hrs del primer día hasta las 12 del siguiente (indicado por 36 hrs en la gráfica) con aumentos en las últimas 8 horas (Figura 25).

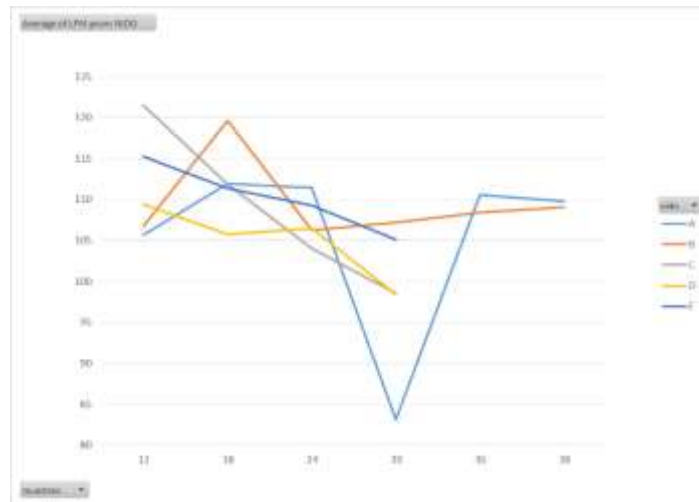


Figura 25. Ritmo cardíaco de huevos por NIDO en periodos de 6 y 2 horas.

10.4.3. Influencia de la temperatura

Es difícil explicar las grandes variaciones entre huevos observadas. Estas variaciones podrían ser ocasionadas por fenómenos intrínsecos naturales o ser causados por influencia de la aplicación del monitor o una interacción de las dos. En este momento no es posible distinguirlos ya que las dimensiones de estas variaciones son similares a las que registran Angilletta *et al.* (2013) para la lagartija *Sceloporus undulatus* usando el mismo monitor, por lo que es posible que lo observado sea reflejo de las variaciones normales del registro con estos monitores o fluctuaciones naturales de los organismos. Probablemente, la primera explicación sea la más aceptable.

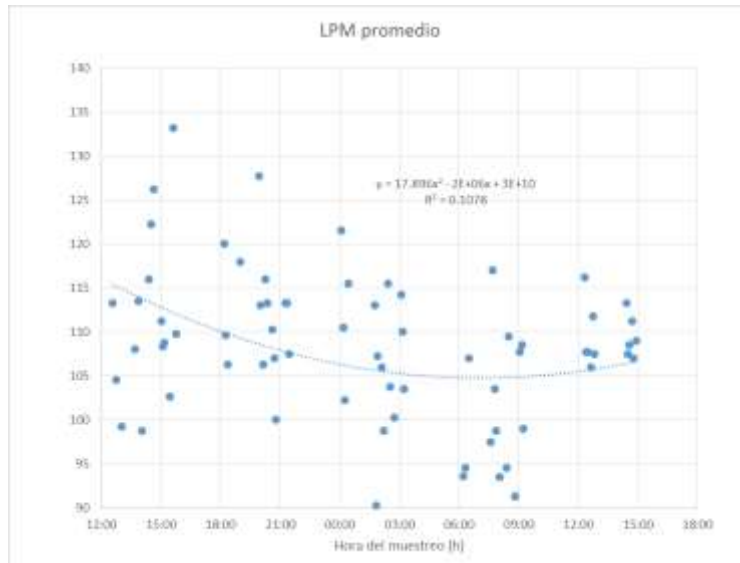


Figura 26. Ritmo cardíaco a lo largo del muestreo.

Sin embargo, al analizar las tendencias generales de los valores de LPM a lo largo del experimento se pudo notar una disminución de los valores en las primeras 24 horas del muestreo (del medio día del primer día al medio día del siguiente) seguido por un aumento en las siguientes 8 (de las 6 a las 12 hrs) (Figura 26). Como esta tendencia observada se asemeja a pequeñas variaciones en la temperatura de la sala de incubación de nidos, se analizaron los datos registrados de la temperatura superficial de los huevos al inicio y al final de cada lectura en el monitor. Estos datos indican que si bien las temperaturas de los huevos al inicio de cada lectura (Figura 27A) no varían sustancialmente e indican que la condición térmica dentro de los nidos es relativamente constante, los valores al final de las lecturas (Figura 27B) manifiesta una tendencia que refleja la que se observó para los valores de ritmo cardíaco (Figura 26). Esto se podría explicar si al sacar los huevos de la incubadora y trasladarlos al monitor, a pesar de mantenerlos dentro de una caja de poliestireno, con cierto nivel de aislamiento térmico, son afectados por una temperatura ambiental que fluctúa a lo largo del día.

Para analizar la presencia de una correlación entre la temperatura final en el huevo y el ritmo cardíaco se graficaron ambas variables (Figura 28) lo que indica una relación directa, aunque baja ($R^2 = 0.119$). Como esta tendencia no es muy estrecha y clara, es evidente que hay otros factores que afectan las lecturas en el monitor *Buddy*, además de la temperatura ambiental del huevo estando fuera de la incubadora. No obstante, es claro que el factor temperatura ejerce una influencia importante y tendrá que ser cuidadosamente controlada en los experimentos subsecuentes de este proyecto.

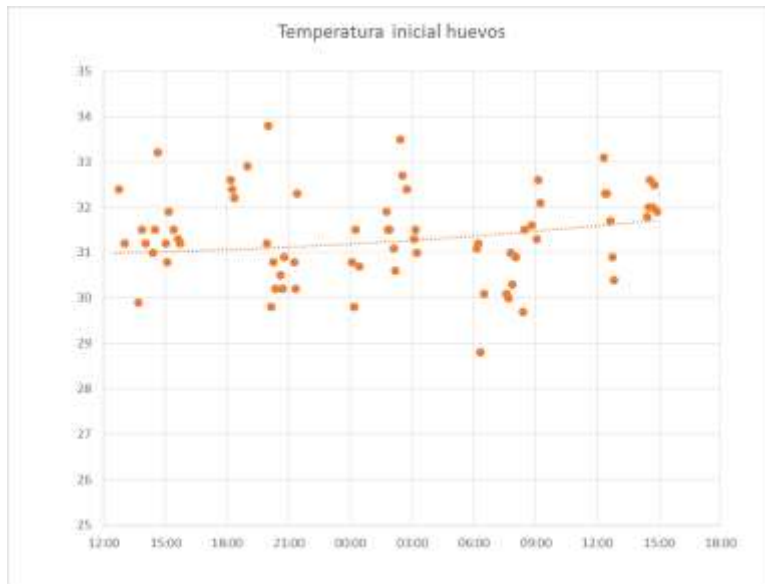
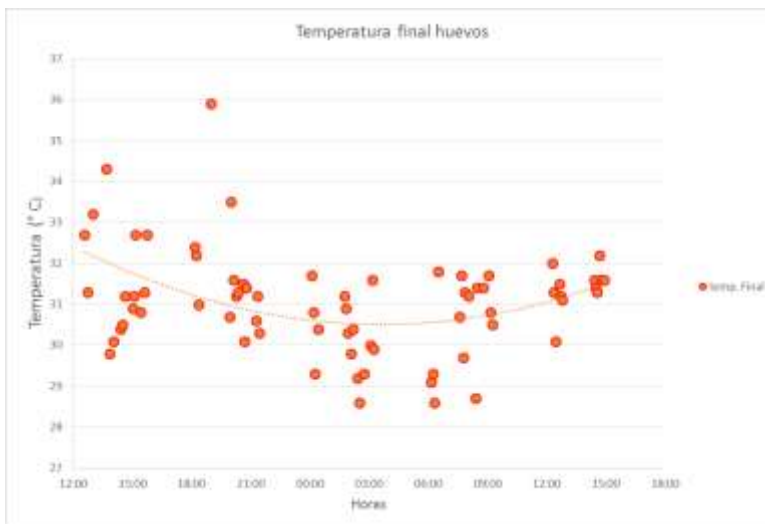
A**B**

Figura 27. Temperatura superficial de los huevos al inicio (A) y final (B) de cada muestreo a lo largo del ciclo de monitoreo.

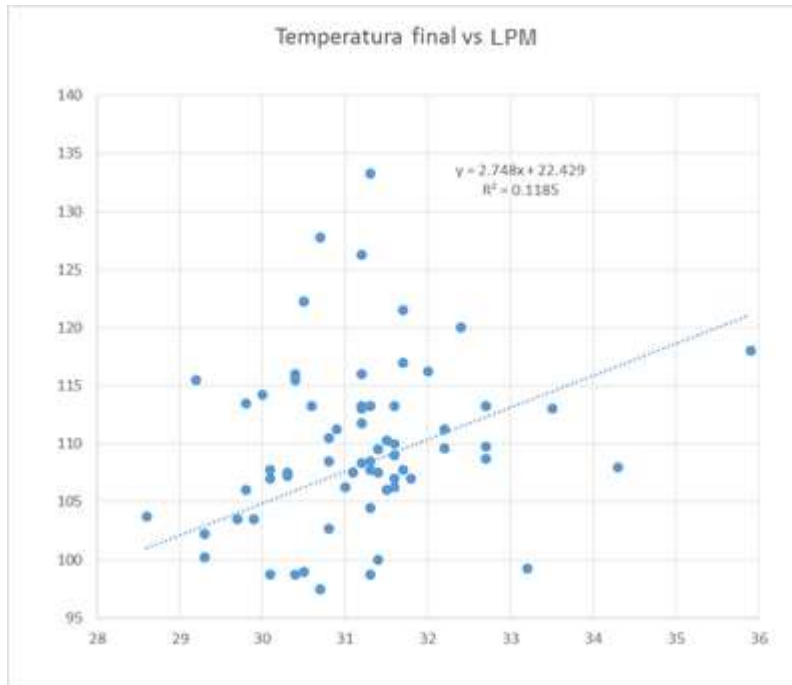


Figura 28. Correlación entre ritmo cardíaco (LPM) y temperatura superficial del huevo al final de cada monitoreo.

10.5. Patrones del ritmo cardíaco y el límite mortal superior de temperatura en embriones de diferentes nidos y en diferentes etapas de desarrollo expuestos a incrementos de temperatura

Los experimentos realizados para este objetivo se llevaron a cabo en dos períodos (marzo y agosto de 2016). En el primero fue posible obtener resultados útiles, pero también se pudo hacer ajustes y mejoras al protocolo que permitió lograr datos de mejor calidad en el segundo período experimental. En algunas partes hemos denotado como “réplicas” estos dos períodos experimentales y fungieron como variables categóricas en los análisis estadísticos.

10.5.1. Detalles de embriones muestreados

Se utilizaron criterios validados en objetivos anteriores para verificar por medio de ovoscopía los rasgos morfológicos indicativos de embriones en sus tres períodos de desarrollo analizados. Las características morfológicas distintivas para el segundo y el tercer tercio que coinciden con el periodo termosensible (PTS) y el periodo sexualmente

determinado (SD) (Merchant-Larios *et al.*, 1997) para identificar embriones que ya alcanzaban niveles de desarrollo análogos en las diferentes incubaciones y aquellas que se llevaron a cabo en diferentes temperaturas. Como orientación también se utilizaron con los resultados obtenidos en la evaluación previa sobre tasa de crecimiento de embriones a las mismas dos temperaturas para aproximar el tiempo correcto de desarrollo para llegar a las fases requeridas del muestreo de marzo (Figura 29 y Tabla 9) como de la repetición de agosto (Figura 30 y Figura 31).

Tabla 9. Periodos muestreados en dos temperaturas de incubación con su respectiva proporción y duración total de la incubación.

Temperatura de incubación (°C)	Fase del desarrollo muestreada	Tiempo de la incubación al momento de muestreo (d)	Proporción del total del desarrollo (%)	Duración de la incubación (d)
32	Primer tercio (1er)	11.8	0.25	47
	Segundo tercio (2do)	23.7	0.50	
	Tercer tercio (3er)	33.7	0.72	
28	Segundo tercio (2do)	42.7	0.64	67
	Tercer tercio (3er)	47.9	0.71	

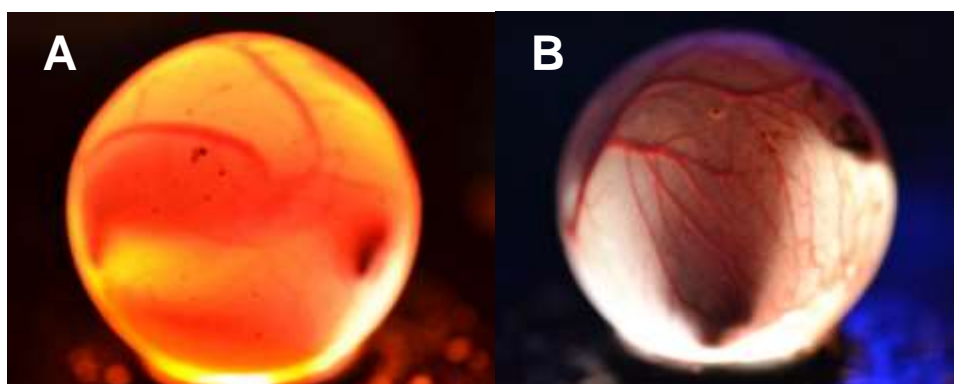


Figura 29. Embriones provenientes de la incubación a 32°C seleccionados para pruebas de estrés térmico en marzo: A) 2do tercio (ojo y caparazón pigmentados) y B) 3er tercio (cabeza, cuello y dorso pigmentados).

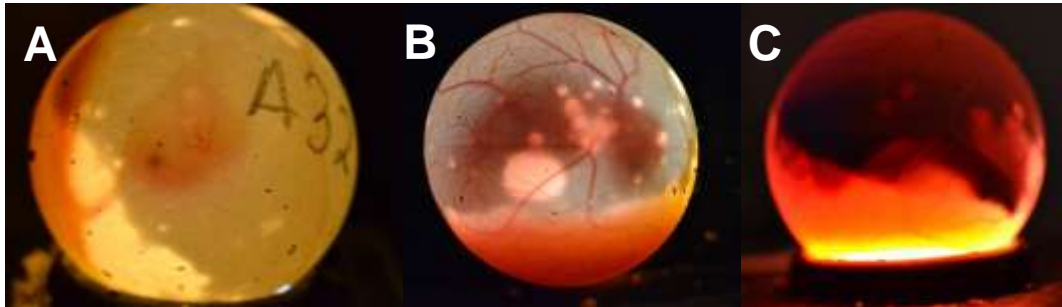


Figura 30. Embriones provenientes de la incubación a 32°C seleccionados para pruebas de estrés térmico en agosto: A) 1er tercio (ojo pigmentado), B) 2do tercio (ojo y caparazón pigmentados) y C) 3er tercio (cabeza, cuello y dorso pigmentados).

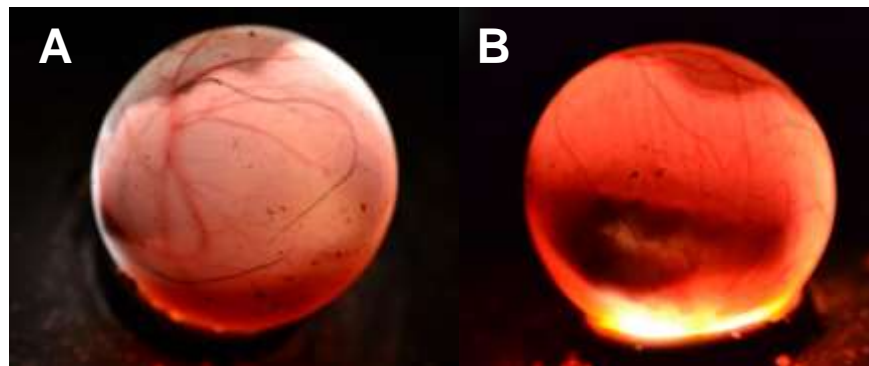


Figura 31. Embriones provenientes de una incubación a 28°C seleccionados para pruebas experimentales de estrés térmico en agosto: A) 2do tercio (ojo y caparazón pigmentados) y C) 3er tercio cabeza, cuello y dorso pigmentados).

Desafortunadamente, los embriones de la incubación a 28°C resultaron demasiado delicados para su manejo, no se lograba detectar latidos como en estadios posteriores y se decidió no intentar experimentar con ellos. Adicionalmente, en la experimentación con esta etapa con embriones incubados a 32°C se observaron niveles relativamente altos de mortalidad durante el experimento.

10.5.2. Seguimiento de los experimentos: temperatura

Evaluaciones de marzo: 2do tercio

Al aplicar el aumento gradual de temperatura (1.5°C/hora) sobre los embriones, se pudieron observar incrementos no-lineales del ritmo cardiaco (Figura 32). Conforme se calentaron los embriones a partir de los 32°C temperatura a la que se habían incubado hasta ese momento, el ritmo aumentó constantemente alrededor de 85-110 latidos por minuto (LPM) al inicio (Figura 32) hasta valores máximos alrededor de 160-170 LPM al

alcanzar los 41-42°C. Cerca de esos valores se mantuvieron más estables, pero no por mucho tiempo. Al continuar el calentamiento por arriba de 42.5°C, se desploman las lecturas de ritmo cardíaco (Figura 32).

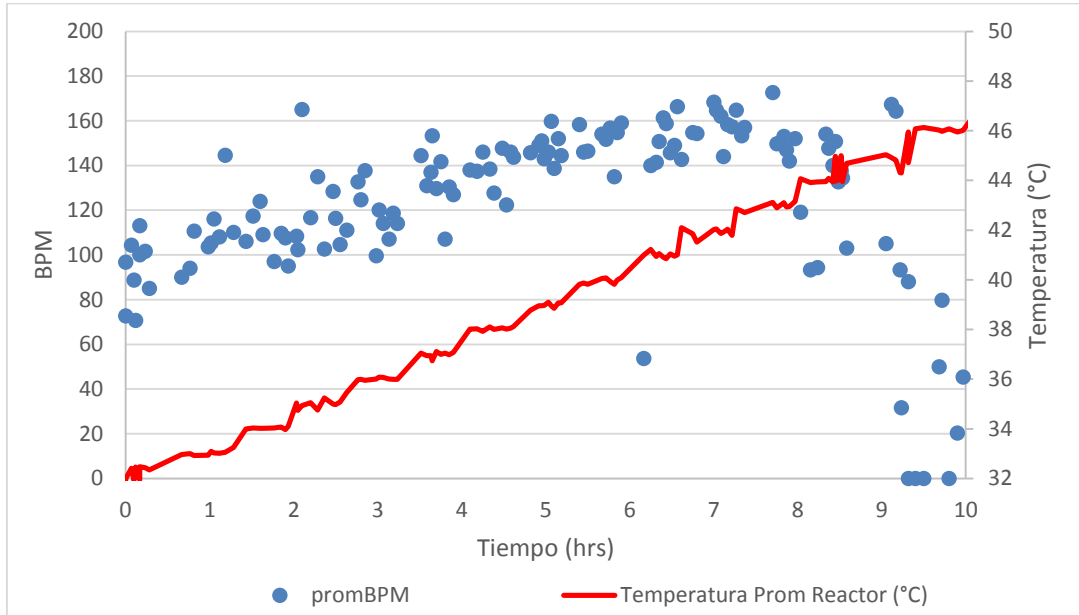


Figura 32. Registros del *Arduino* para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) en el monitor *Buddy* para embriones en 2do tercio de marzo.

El experimento se realizó a lo largo de aproximadamente 10 horas durante un día (Figura 32) manteniendo la temperatura de la cámara experimental dentro del ritmo de cambio programado y a pesar de la transferencia de los huevos para las determinaciones por el sistema *Arduino* y sensores de temperatura. Los cambios de temperatura que se observan son ocasionados por el aumento programado que solo puede realizarse de manera escalonada y el sistema deja de calentar cuando alcanza y se estabiliza por el tiempo especificado, y luego vuelve a aumentar al siguiente. Cuando llega a cada temperatura requerida, en ese momento se trasladaban los embriones para las determinaciones.

Evaluaciones de marzo: 3er tercio del desarrollo

De igual manera que en el experimento anterior, cuando se aplicó el aumento de temperatura sobre los embriones en 3er tercio, se observó un aumento del ritmo cardíaco (Figura 33) desde valores iniciales de 90-110 LPM (similar a los embriones en 2do tercio, pero en este caso los valores máximos alcanzados parecen centrados alrededor de 140-150 LPM (menores que en 2do) al llegar a la misma temperatura de 40-41° C. Al continuar

el calentamiento por arriba de los 41.5° C las lecturas de ritmo cardíaco se desploman (Figura 33). Esta evaluación también duró aproximadamente 10 horas.

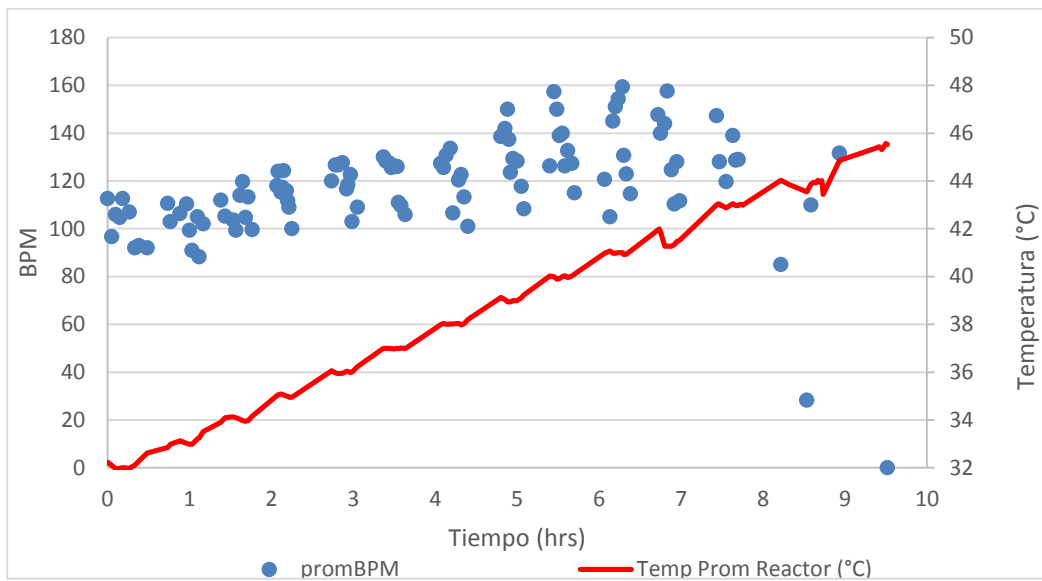


Figura 33. Registros del *Arduino* para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés puntos azules) para embriones en 3er tercio de marzo.

Un dato importante en este experimento, es que del total de los nueve huevos en 3er tercio usados para dicho experimento, sólo un huevo se mantuvo cerrado y se logró registrar su ritmo cardíaco hasta cesar. Por otro lado, los otros ocho huevos eclosionaron durante el calentamiento, aun cuando su desarrollo embrionario no había sido completado. Se asume que eclosionan cuando sacan la cabeza y/o una aleta fuera del cascarón y otros únicamente presentaron *pipping* o cuando rasgan el cascarón. Este comportamiento inesperado sucedió al estar sometidos a una temperatura aproximada entre 42-45°C y definitivamente ya no permitió continuar con su registro de ritmo cardíaco en el monitor *Buddy* (Figura 41).

Evaluaciones de agosto: 1er tercio

Para las evaluaciones de la réplica de agosto se aplicó de igual manera el aumento gradual de temperatura (1.5°C/hora) a los embriones, y se observan incrementos no-lineales del ritmo cardíaco. En esta fase de desarrollo se manejó una temperatura de incubación en la que a partir de los 32°C se incrementó el ritmo cardíaco y se obtuvieron valores basales entre 90-130 LPM hasta llegar a valores máximos alrededor de 150-190 LPM cuando se alcanzaba los 36-38°C. Los valores se mantuvieron estables por poco

tiempo hasta que el calentamiento continuó y las lecturas de ritmo cardíaco se desplomaron entre 43-45°C (Figura 34).

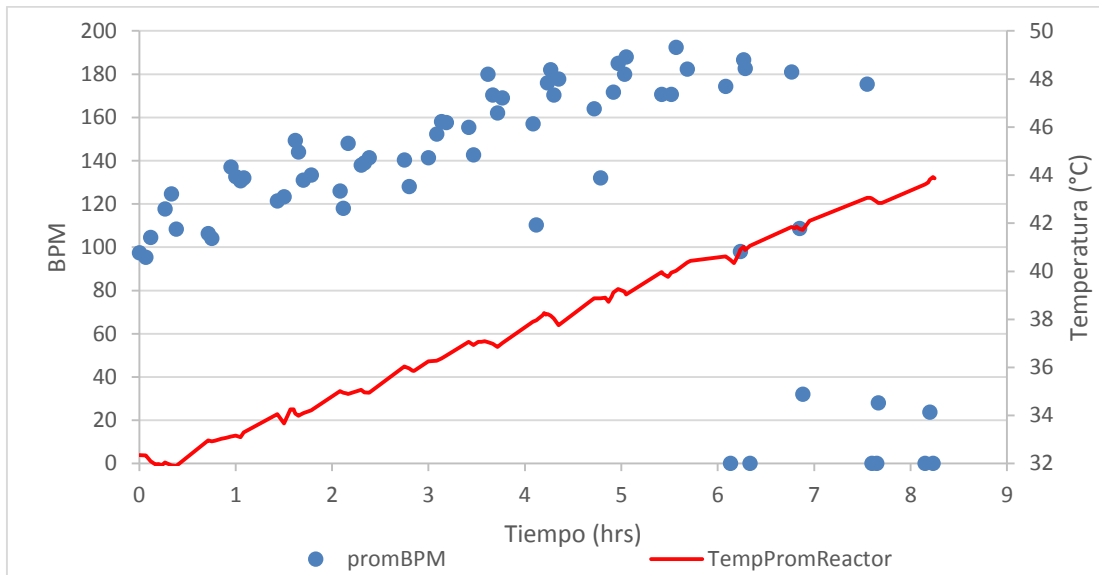


Figura 34. Registros del *Arduino* para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) en el monitor *Buddy* para embriones en 1er tercio de agosto.

El experimento se realizó durante 8 horas aproximadamente (Figura 34) y se mantuvo la temperatura de la incubadora experimental dentro de la tasa de velocidad de cambio programado a pesar de los cambios de embriones para las determinaciones.

Evaluaciones de agosto: 2do tercio

Los incrementos no-lineales del ritmo cardíaco se observaron conforme se aplicaba el aumento de temperatura a los embriones a partir ya sea de 28° o 32°C, temperatura a la que se habían incubado hasta ese momento. En la incubación de 32°C se iniciaba en valores basales entre 100-120 LPM (Figura 35) y para la incubación de 28°C los valores basales eran menores alrededor de 85-110 LPM (Figura 36) llegando hasta valores máximos alrededor de 175-185 LPM a 40-41°C y 160-170 LPM a 41-42°C para embriones provenientes de 32° y 28°, respectivamente. Cuando se continua el calentamiento los valores se quedan un tanto estables pero por poco tiempo hasta que se desplomaban las lecturas de ritmo cardíaco a ceros en temperaturas alrededor de 45-46°C para embriones provenientes de una incubación de 32° y 46-47°C para los embriones de 28°C (Figura 35 y Figura 36).

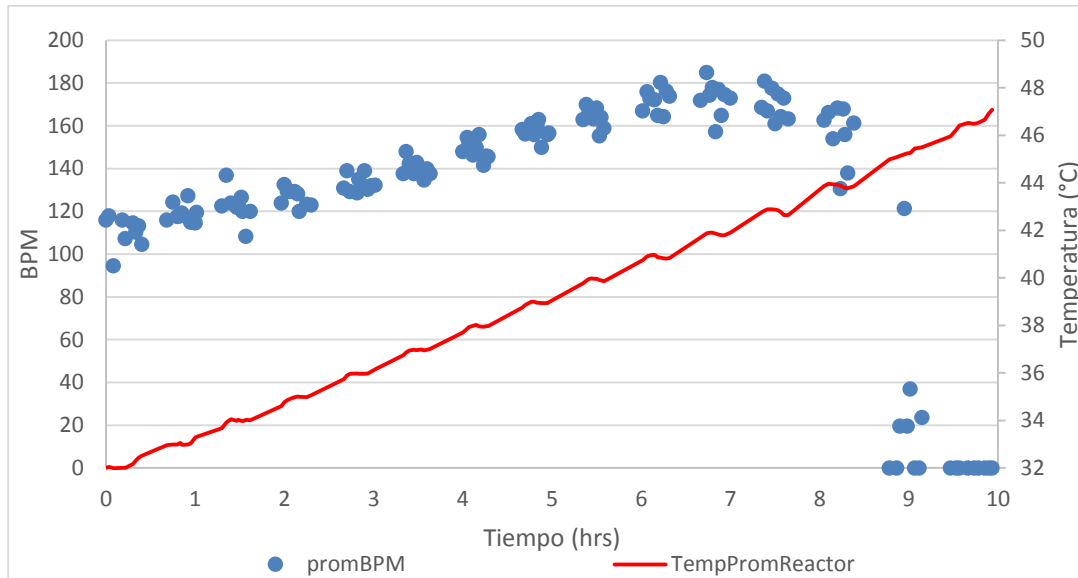


Figura 35. Registros del *Arduino* para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) para embriones en 2do tercio de agosto.

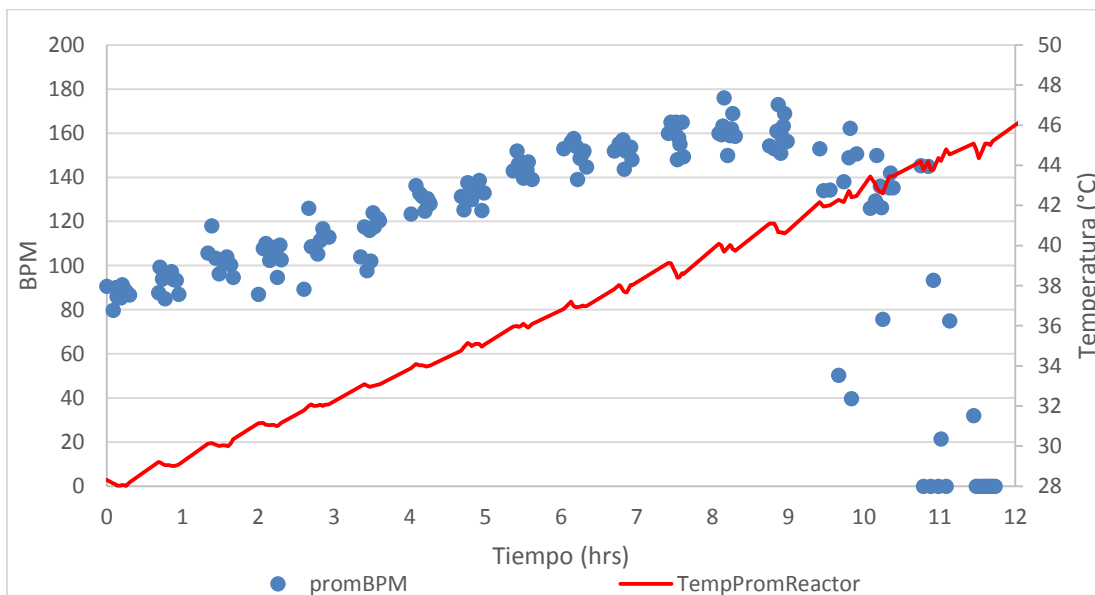


Figura 36. Registros del *Arduino* para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 28°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) para embriones en 2do tercio de agosto.

Las evaluaciones se realizaron durante casi 10 horas aproximadamente iniciando a partir de 32°C (Figura 35) y se tomó 12 horas para la prueba a partir de 28°C (Figura 36). Para

ambas pruebas se mantiene y se incrementan los valores de temperatura constantemente en la incubadora experimental.

Evaluaciones de agosto: 3er tercio

De igual manera que en las pruebas experimentales anteriores, al aplicar un aumento de temperatura a los embriones se observó un aumento en el ritmo cardíaco iniciando en valores basales de 90-115 LPM para ambos grupos de embriones incubados a partir de 32° como de 28°C. Se continuó con el calentamiento y es cuando alcanzaron valores máximos de ritmo cardíaco alrededor de 165-175 LPM y 140-150 LPM para embriones provenientes de una incubación de 32° y 28°C (respectivamente, Figura 37 y Figura 38) ambos valores máximos se alcanzaron en temperaturas similares de 40-41°C (igual que en 2do tercio de agosto). En este momento, los valores se mantuvieron estables pero con la aplicación de temperatura llegó el paro cardíaco en temperaturas alrededor de 45-46°C para el conjunto de embriones pertenecientes a ambas temperaturas de incubación (Figura 37 y Figura 38).

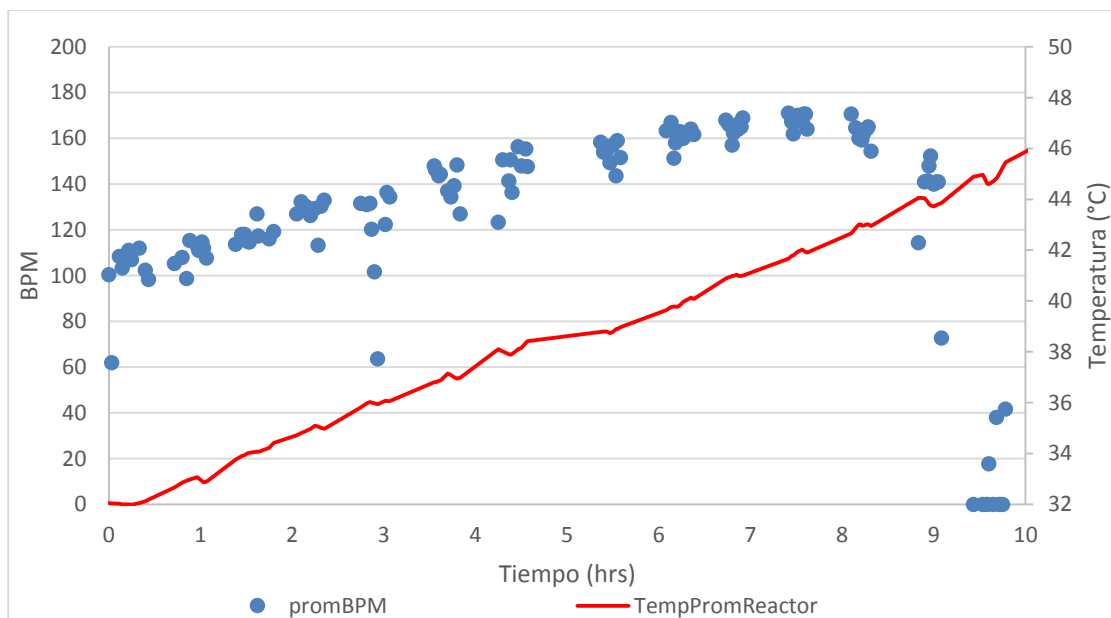


Figura 37. Registros del *Arduino* para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 32°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) para embriones en 3er tercio de agosto.

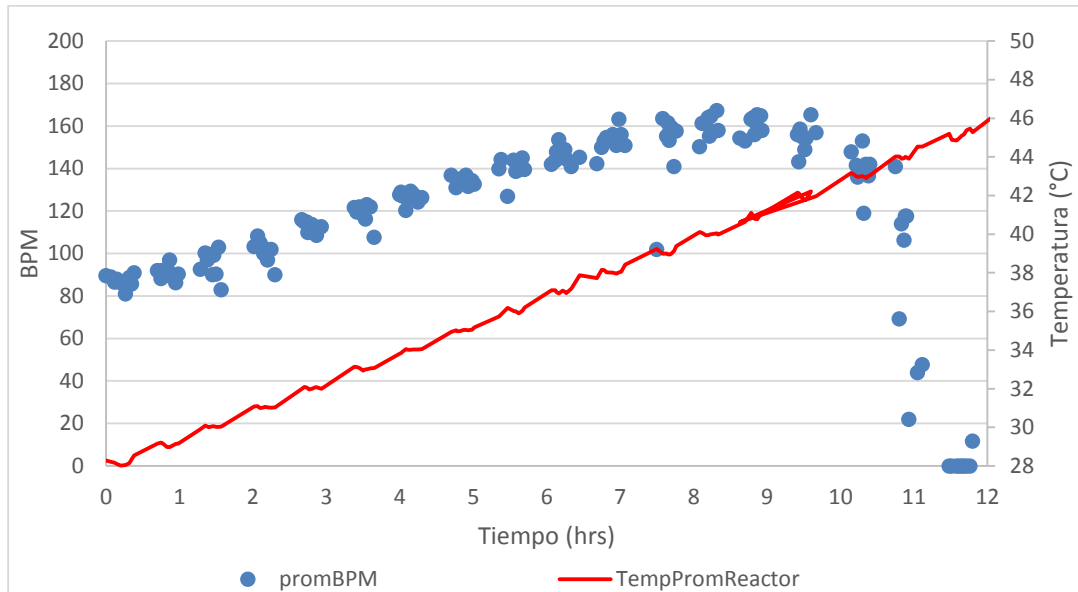


Figura 38. Registros del *Arduino* para la temperatura en la cámara de experimentación a partir de 28°C (línea roja) y determinación de los valores del ritmo cardíaco (BPM, por sus siglas en inglés, puntos azules) para embriones en 3er tercio de agosto.

De igual manera que el 2do tercio de agosto el experimento duró 10 horas aproximadamente iniciando a partir de 32°C (Figura 37) y tomó 12 horas para la prueba a partir de 28°C (Figura 38).

10.5.3. Seguimiento de los experimentos: condición de embriones al finalizar estrés

Una vez que finalizaron las pruebas experimentales sobre el ritmo cardíaco, se procedió a devolver a los embriones experimentales a su incubadora original a 32° C con el fin de permitir su desarrollo en caso de no haber muerto.

De los nueve huevos que se sometieron a aumentos de temperatura, días después de los experimentos todos los embriones murieron. Se corroboró con ayuda de la ovoscopia, determinando que los embriones no presentaban movimiento alguno y el sistema vascular se empezaba a degradar y/o había la presencia de una pequeña mancha de sangre que se concentraba en una parte del huevo, que durante el desarrollo embrionario no se había observado (Figura 39).



Figura 39. Observaciones por ovoscopia de los embriones en el segundo tercio del desarrollo sometidos a estrés térmico indicando muerte: embrión sin movilidad (izquierda) e inicio de la degradación del sistema vascular y mancha de sangre (derecha).

En los días posteriores, notamos que ya presentaban un olor desagradable y el sistema vascular ya no era visible en comparación de cómo se mostraba en un inicio del experimento y su apariencia era un poco traslúcida y muy blanda. En algunos casos se les observaban hongos en el cascarón con presencia de manchas verdes, por lo que fue necesario extraerlos de la incubadora para evitar el contagio de alguna infección al resto de los embriones viables incubados. Se les realizó una disección donde se observó que en la mayoría de los huevos la yema se había solidificado y confirmamos que el embrión había muerto (Figura 40).





Figura 40. Embriones después de algunos días de su muerte: degradación total del sistema vascular y presencia de hongos (arriba), yema cocida y muerte definitiva del embrión (abajo).



Figura 41. Evidencias de señales de vida en embriones en periodo sexualmente diferenciado sometidos a calentamiento: pipping (izquierda) y eclosión (derecha).

Una vez finalizadas las pruebas experimentales sobre el ritmo cardíaco, se colocaron en charolas individuales para no perturbar a los huevos control y se devolvieron tanto los embriones eclosionados y con *pipping* como los embriones muertos debido al calentamiento a su incubadora de origen a 32°C con el fin de observar si lograban sobrevivir a pesar del estrés térmico (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

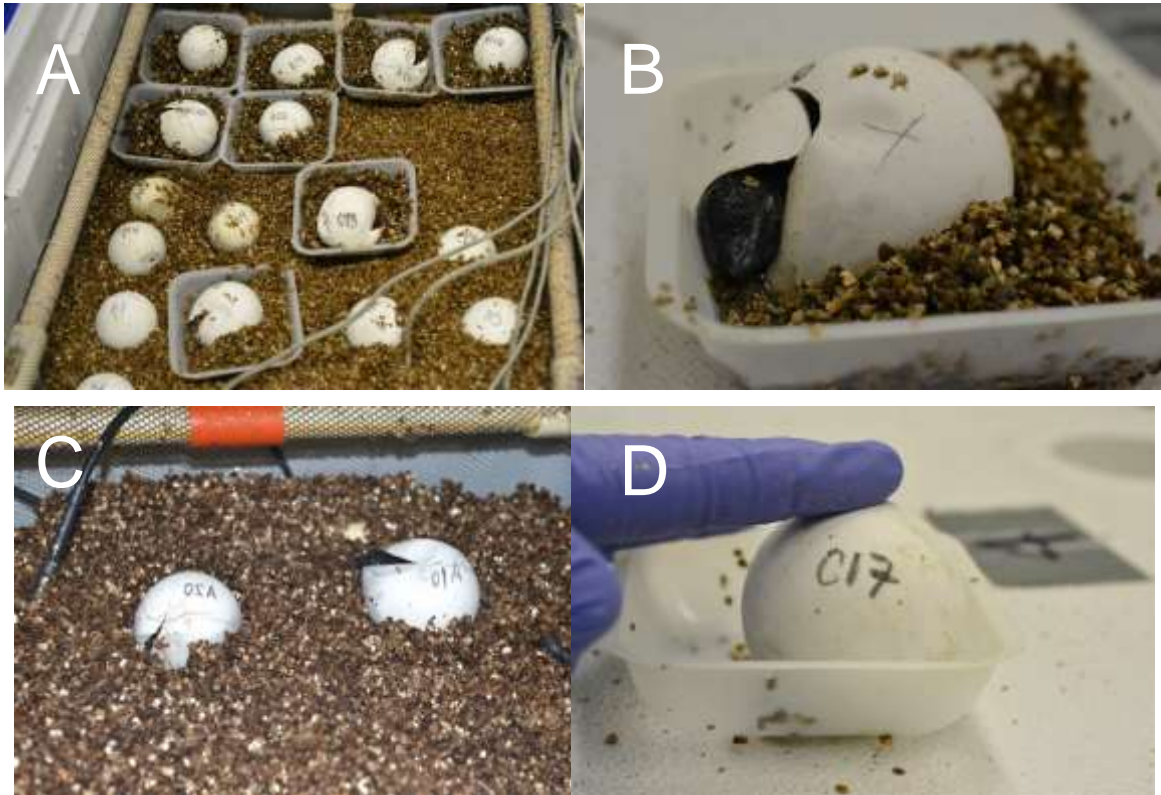


Figura 42. Seguimiento de embriones experimentales: regreso de embriones a incubadora de origen (32°C) (A); embrión eclosionado durante la prueba térmica (B); embriones en *pipping* (C) y embrión muerto en prueba experimental (D).

Al cabo de dos días posteriores a las pruebas, cinco de los embriones que rasgaron el cascarón cuando fueron sometidos a calentamiento, mostraron movimiento y eclosionaron. Los tres embriones restantes murieron sin terminar su eclosión y comenzaron a descomponerse. El huevo que se mantuvo cerrado después del calentamiento, al cabo de unos días se revisó por ovoscopía y se observó que su sistema vascular era menos marcado y tampoco presentaba movimiento. Por disección se confirmó su muerte (Figura 43).

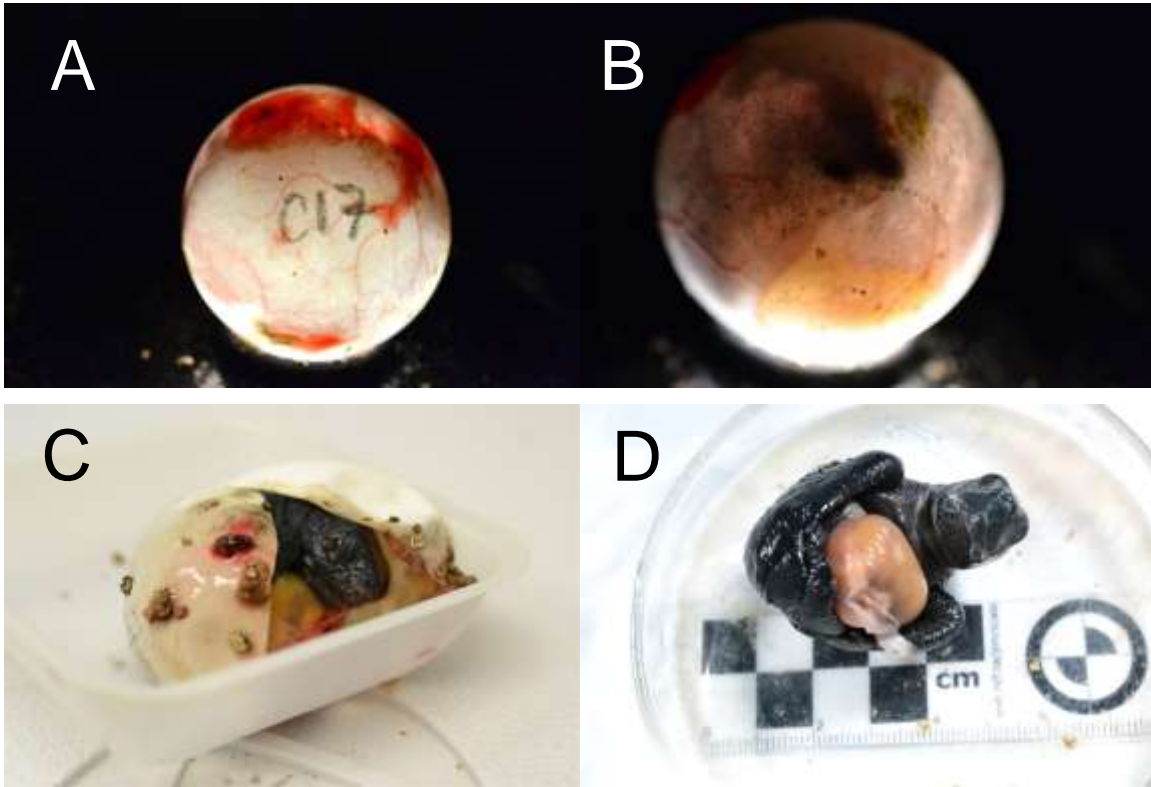


Figura 43. Muerte embrionaria después de algunos días: degradación parcial del sistema vascular (A); presencia interna de hongos (B); muerte de embrión verificado por disección (C) relación de tamaño-vitelo (D).

10.5.4. Seguimiento de los experimentos: mortalidad de embriones experimentales

Al inicio de la incubación a 32° C se tenían 56 posibles embriones viables, conforme el desarrollo embrionario avanzaba y con ayuda del trabajo de ovoscopia, se descartaron nueve huevos que bajo al ovoscopio se observaban en un color totalmente amarillo y sin vascularización, es decir se consideraron como inviables y para confirmar esto se les realizó disección en donde observamos únicamente la formación de la yema y sin formación de posible embrión (Figura 44).



Figura 44. Visualización de huevos inviables sin vascularización visible.

Por lo anterior restaron 47 huevos bajo incubación, esto sin contar los 18 huevos que se utilizaron para las pruebas experimentales tanto en embriones en periodo termosensible como en embriones en periodo sexualmente diferenciado, por lo que finalmente teníamos 29 huevos control en total. Diez de los huevos control no llegaron a su eclosión final y los 19 embriones restantes eclosionan con éxito. Por lo tanto, se obtuvo un porcentaje de mortalidad en huevos control de un 34.5%, mientras que se obtiene un total de 44.8% del porcentaje de mortalidad para las pruebas de estrés térmico, siendo 31% y 13.8% de mortalidad para embriones en periodo termosensible y sexualmente diferenciado, respectivamente.

Estos resultados nos indican que los embriones pueden eclosionar exitosamente si se mantienen en sus temperaturas óptimas a lo largo del desarrollo embrionario, por el contrario, si se aumentan las temperaturas de incubación, tal como se hizo en las pruebas, el porcentaje de mortalidad aumenta para los embriones, mostrando registros de LPM al máximo tolerando el aumento de temperatura y finalmente el corazón se colapsa y muera el embrión.

A continuación, se describen los resultados obtenidos que nos ayudaron a confirmar la capacidad del monitor *Buddy* para medir el ritmo cardíaco a través de un aumento gradual en la temperatura dentro de las incubadoras elaboradas en el Laboratorio de Genética.

El potencial eléctrico es característico en cada tipo de corazón, en las tortugas marinas, los corazones generan secuencias de ondas más complejas, debido a que poseen tres cámaras (2 atrios y 1 ventrículo) y la repolarización en los músculos crea ondas particulares (Wyneken & Witherington, 2001). En las siguientes figuras se muestran algunas representaciones de la frecuencia cardíaca medida en los embriones a través de las pruebas experimentales. Se observa un patrón de “sube y baja”, en donde el latido que registra el monitor va en aumento y después desciende y se recupera a su línea base y

vuelve a aumentar rebasando su línea base (Figura 45). Esto es gracias a los movimientos de sístole y diástole que presentan estos animales.

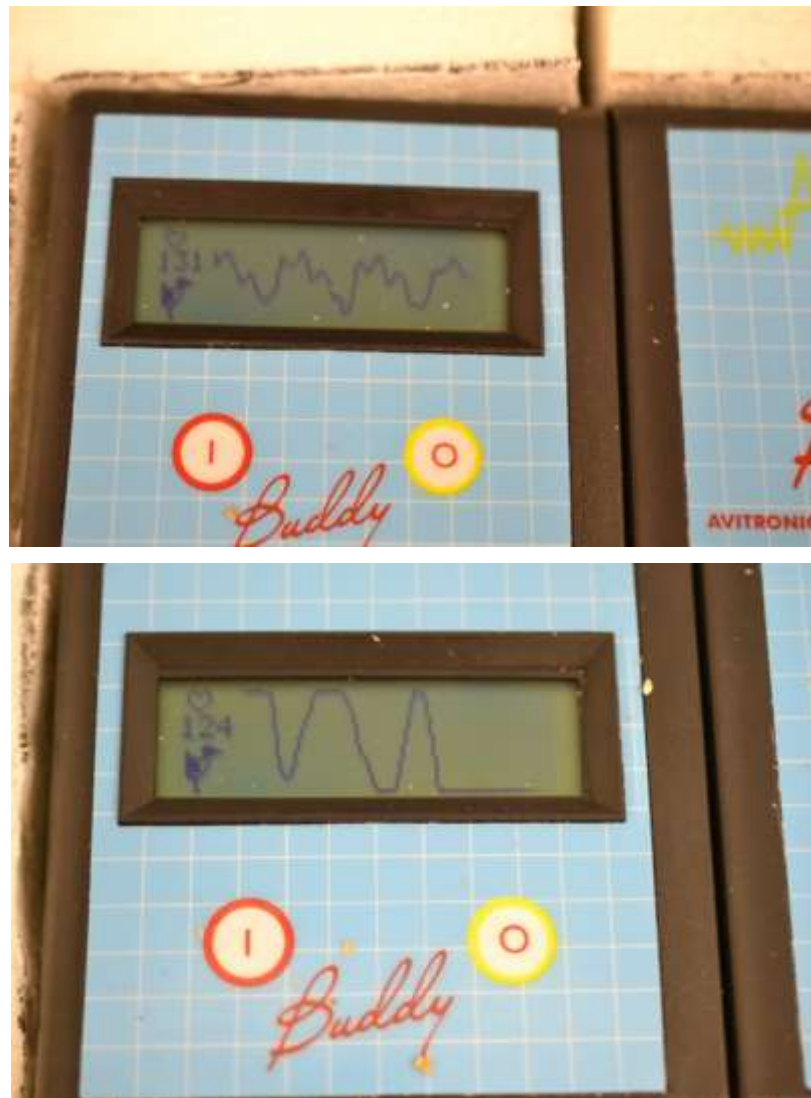


Figura 45. Registros de frecuencia cardíaca (LPM) de los embriones medidos con ayuda del monitor *Buddy*.

10.5.5. Seguimiento de los experimentos: pérdida de humedad

El calentamiento de los huevos dentro de nuestro sistema experimental ocasionó una ligera pérdida de humedad que se estimó en 0.34% para los embriones en etapa PTS. En los embriones en periodo sexualmente diferenciado, no se registró este dato ya que ocho de los nueve huevos analizados rompieron el cascarón. No se conoce si este evento fue ocasionado por cambios en la presión hidrostática, o si a esta etapa el embrión reacciona

activamente agilizando la eclosión. En los embriones en PTS, todos sus cascarones permanecieron cerrados, aunque si mostraron evidencia de afectación en la cáscara que se tornó blanda y más traslúcida (Figura 46).



Figura 46. Pérdida de humedad en embriones en PTS (izquierda) y SD (derecha).

10.5.6. Ajuste a los valores de temperatura registrados

De evaluaciones previas persistió una preocupación de que podría haber diferencias en las temperaturas registradas por los sensores en la incubadora respecto a las temperaturas reales dentro de los huevos durante los experimentos de tolerancia térmica. Para evaluar este fenómeno, se diseñó un experimento usando dos pelotas de ping-pong cuyo diámetro de 3.9 cm es muy similar en dimensiones a los huevos de las tortugas marinas (diám promedio = 3.6 cm). Las pelotas fueron rellenas con agua salina isotónica al 36% (g/100ml) (Figura 47) con la intención de que las pelotas con agua pudieran comportarse como la masa del embrión dentro del huevo durante el experimento y derivar así correcciones razonables de este parámetro en los experimentos.

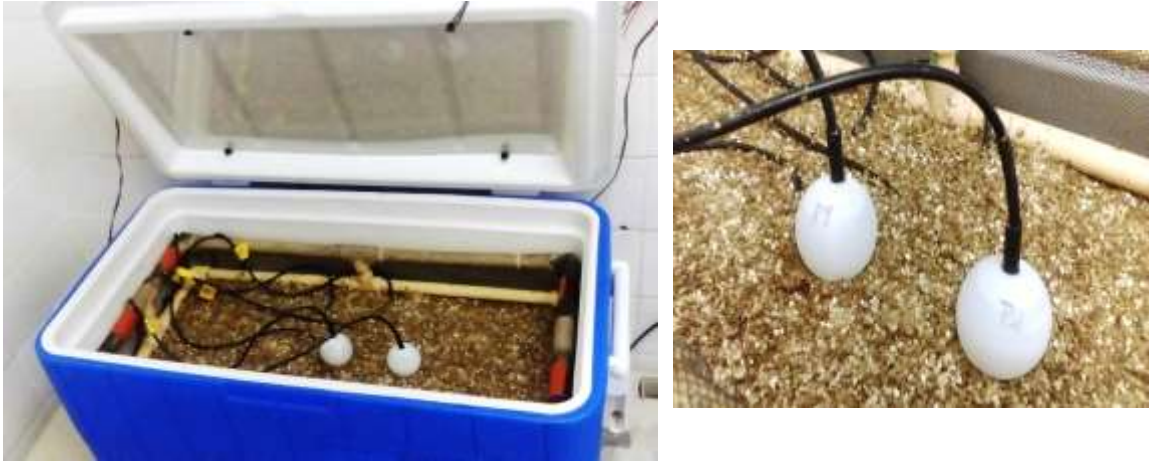


Figura 47. Incubadora experimental con pelotas de ping-pong rellenas de agua con sal con un sensor dentro de cada pelota para el registro de temperatura interna.

Se utilizó la misma incubadora que se manejó para la aplicación de estrés térmico a los huevos experimentales, con mismas tasas de incremento de temperatura (1.5°C/hr) controlado por el programa *Arduino*. La temperatura se registró cada 10 segundos con seis sensores previamente calibrados: cuatro sensores digitales en la incubadora y otros dos (uno en cada una de las pelotas) introducidos por una perforación con el fin de obtener los registros de temperatura interna. Asimismo, con un termómetro infrarrojo (IR) se midió la temperatura superficial de las pelotas a 2cm de distancia para comparar las temperaturas con los registros de los sensores internos.

Los registros obtenidos (Figura 48) mostraron que la temperatura al interior de las pelotas, aunque fue incrementando con la misma velocidad, siempre mantuvo valores menores. Esto indica que las temperaturas que se registran en los sensores de la incubadora durante los experimentos serán siempre mayores a los que experimenta el embrión hacia adentro del huevo. Por otro lado, las temperaturas registradas por el termómetro IR también fueron menores, pero sustancialmente distintas a las que se registraron con el sensor colocado al interior de las pelotas. Con estos resultados se decidió no utilizar los datos de temperatura tomados con el IR por ser menos confiables y procedimos a estimar un factor de corrección de la temperatura experimental sobre la base de los datos de temperaturas dentro de las pelotas.

Este experimento duró 7 horas y se obtuvieron más de 2,000 registros. La diferencia entre el valor de temperatura hacia el interior de las dos pelotas y los de sensores en la incubadora no varió mucho (Figura 48). El promedio global de 0.59°C menor al valor de la

incubadora fue utilizado de aquí en adelante para corregir los datos de temperatura registrados en los experimentos de tolerancia térmica.

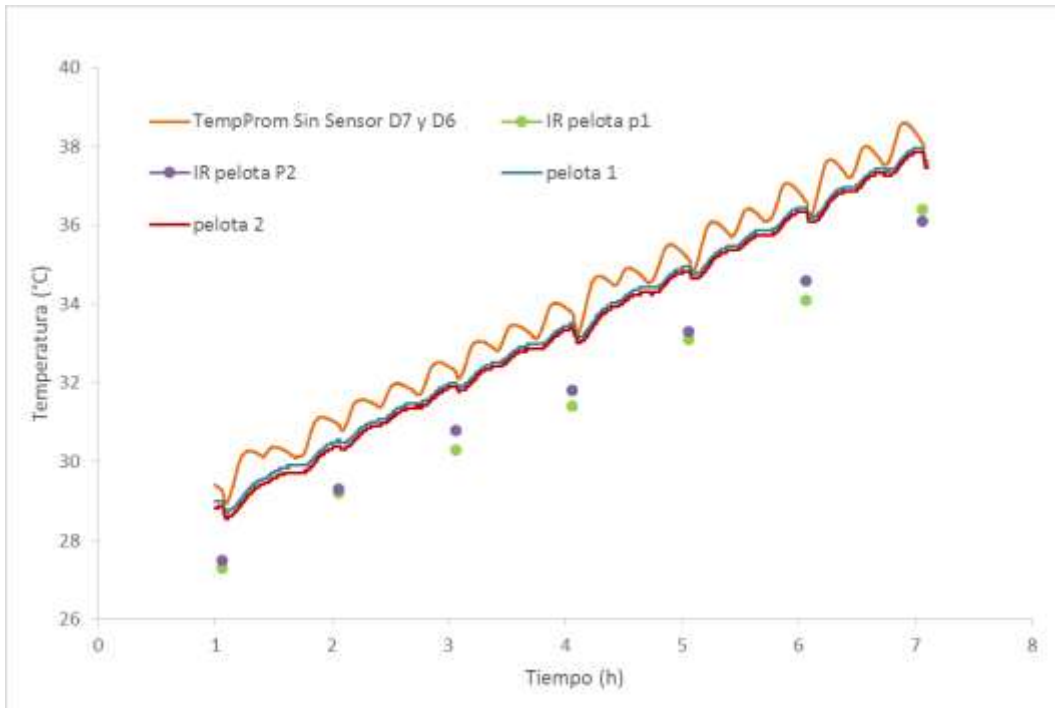


Figura 48. Temperaturas registradas en sensores introducidos a pelotas de ping-pong (pelota 1 y 2) comparado con temperaturas medidas por IR (IR pelota p1 y p2) sobre la superficie de las pelotas y el seguimiento con sensores de la temperatura promedio en la incubadora (TempProm).

10.5.7. Modificaciones en el protocolo para el segundo experimento de estrés térmico (agosto 2016)

Se realizaron repeticiones del experimento en el mes de agosto con embriones de dos nidos nuevos (AA y BB). A diferencia de las corridas anteriores, esta vez se instalaron dos incubadoras con muestras de cada uno de los dos nidos mantenidos a 28° y 32°C para determinar el efecto de diferentes temperaturas de incubación. Adicionalmente se planeó evaluar las tres etapas de desarrollo de interés, una en cada tercio del período de incubación. Debido a que la tasa de crecimiento a estas dos temperaturas es marcadamente distinta, el tiempo bajo incubación previo a la experimentación fue mucho menor para embriones muestreados de la incubación a 32°C (duración total de la incubación = 47 d) que para los de 28°C (duración total de la incubación = 67 d). La muestra de huevos del primer tercio de la incubación fue nombrado de acuerdo al tercio correspondiente del desarrollo (1er, 2do y 3er tercio).

Cabe mencionar que en esta repetición de los experimentos, se benefició de la experiencia previa lo que significó (i) un mejor manejo del monitor de ritmo cardíaco. En particular se observó una disminución en la variación del registro cardíaco por lo que se pudo obtener series de datos más consistentes y, suponemos, más confiables. Asimismo, se realizaron evaluaciones adicionales para mejorar la información relacionada con las mediciones de temperaturas para derivar correcciones más confiables, como se describe a continuación.

10.6. Análisis estadístico

En todos los experimentos de estrés térmico se observó un mismo patrón general del cambio en el ritmo cardíaco conforme se calentaban los embriones. Al inicio del experimento se registró el ritmo cardíaco basal que corresponde al valor para la temperatura de incubación (promedio de 90 LPM para embriones de 28°C y 109 LPM para los de 32°C). De allí en adelante, el rendimiento cardíaco aumentó de manera gradual y lineal (“fase lineal de respuesta”, Figura 49) entre temperaturas de 38°C y 41°C. Aunque en esta fase se observaron diferencias asociadas con algunos de los parámetros medidos y que serán explicadas en esta sección, la persistente respuesta a los aumentos de temperatura con incrementos en el ritmo cardíaco refleja que los embriones mantienen una capacidad para responder fisiológicamente a las condiciones cambiantes a las que se le está sometiendo, aumentando su tasa metabólica. Los valores máximos del ritmo cardíaco oscilaron alrededor de 170-180 latidos por minuto (LPM) cuando se alcanzaba una temperatura de alrededor de 40-41°C al cabo de 7-8 horas. Posteriormente, el ritmo cardíaco se desplomó hasta que se provocaba un paro cardíaco (ritmo cardíaco = 0).

Para el análisis estadístico de la respuesta al estrés térmico optamos por hacerlo por separado en dos partes para facilitar la derivación de parámetros con distintas pruebas estadísticas. Para la primera parte que se comporta esencialmente de manera lineal se aplicaron *modelos lineales* y *lineales mixtos*. Estos análisis derivan estimaciones de pendientes e intersecciones y contienen parámetros bien conocidos. Otra ventaja de hacer por separado el análisis de esta fase es que se aprovechó mejor el conjunto de datos obtenidos en nuestros experimentos, ya que particularmente en la prueba experimental para el primer tercio (1er) de desarrollo, varios embriones murieron tempranamente antes de completar el ciclo y por ende no se tienen datos durante todo un período experimental para algunos de estos embriones.

En la segunda parte de la evaluación estadística se analizó el seguimiento completo, aplicando *modelos generalizados aditivos mixtos* siguiendo la metodología de Angilletta *et al.* (2013) debido a la compleja curva de respuesta en el comportamiento. Asimismo, se lograría una comparación de nuestros resultados con los de dicho estudio.

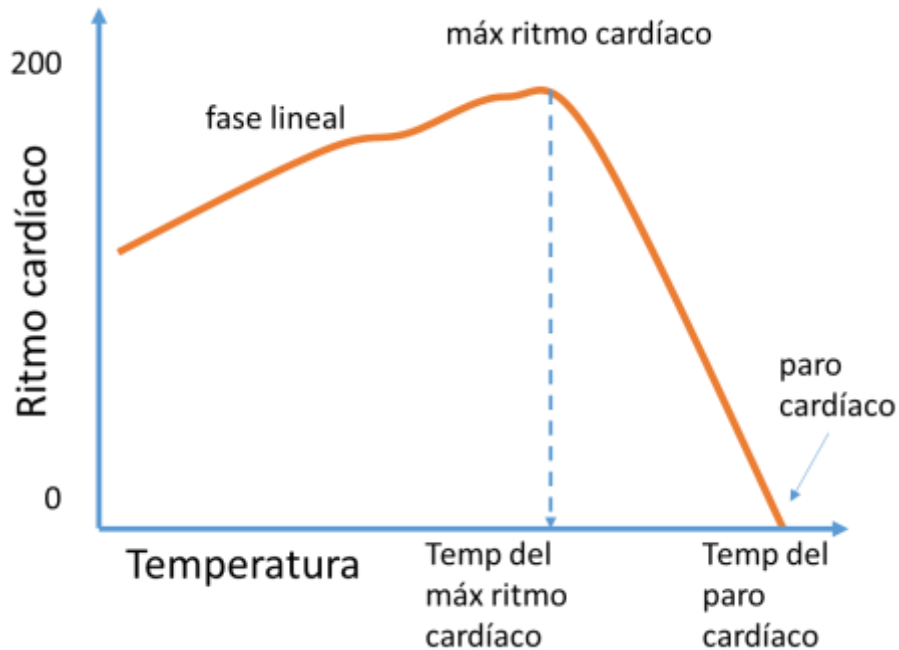


Figura 49. Curva idealizada del comportamiento del ritmo cardíaco en función de un aumento gradual de temperatura.

10.6.1. Fase lineal de la respuesta al estrés térmico

El análisis de la primera fase se realizó utilizando los datos correspondientes al proceso desde el inicio de la exposición a temperaturas crecientes hasta la obtención de los valores máximos de ritmo cardíaco para cada huevo.

Primeramente, se identificaron los modelos más probables construyendo alternativas de modelos lineales y lineales mixtos con las rutinas **lme** dentro de la librería *nlme* del paquete estadístico R (Versión 3.3.2). La variable de respuesta utilizada fue el **ritmo cardíaco** promedio en latidos por minuto (BPM por sus siglas en inglés, **promBPM**) en función de la variable explicativa, **temperatura** de exposición. Para los fines del análisis se utilizaron los valores ajustados de las temperaturas aplicadas en la incubadora experimental como se describió anteriormente (**TempPromAjustada**). Adicionalmente, se evaluaron como variables explicativas categóricas:

- la temperatura de incubación previa a la prueba de estrés térmico (**TempInc**: 28° o 32°C)
- la etapa de desarrollo a la que se muestrearon los embriones (**PP** = primer tercio, **PTS**= segundo tercio; **SD**= tercer tercio)
- peso (g) del huevo al inicio de la incubación (**PesoInc**)
- nido de origen (**nido**; A, B, o C en experimento de marzo; AA o BB en el de agosto)
- identificador del huevo (**idhuevo**)
- fecha de repetición del experimento (**marzo** o **agosto**)
- fase de la curva (fase lineal o de “**incremento**”)

Se analizó el efecto de nido comparando dos modelos usando la paquetería *nlme* de R:

```
mod.ri <-lme(promBPM~TempPromAjustada+ Etapa+TempInc+PesoInc+Repeticion,
             random=~1|Nido,data=incremento, method="REML")
mod <- gls(promBPM~TempPromAjustada+Etapa+TempInc+PesoInc+Repeticion,
           data=incremento, method="REML")
```

Estos dos modelos son significativamente diferentes (ANOVA L. ratio = 26.70177, P <.001) y el primero tiene un mejor ajuste (Tabla 10) ya que se observó un menor valor de AIC. En ese, el factor aleatorio *Nido* exhibe un efecto significativo indicando que hay variación aleatoria entre los distintos nidos sometidos a la misma combinación de las variables explicativas (*Etapa*, *TempInc*, *TempPromAjustada*). Dicha variación aleatoria está dada por la correlación intraclase para cuantificar el grado en que los individuos con un grado fijo de relación se parecen. Esto indica que los embriones dentro de cada nido no son independientes. Esto sugiere que en futuros experimentos no es necesario aumentar el número de huevos a muestrear, ya que no conduce a la mejora del modelo pero si sería recomendable aumentar el número de nidos con pocos embriones en cada uno.

Tabla 10. Estadística inferencial para el modelo con mejor ajuste que explica la contribución de las variables.

Variable	Std. Error	DF	t-value	P- value
<i>TempPromAjustada</i> (temperatura en aumento para el estrés térmico)	0.100	668	61.527	<.001
<i>Etapa</i> (etapa de desarrollo)	1.466	668	-9.506	<.001

<i>TempInc</i> (temperatura de incubación)	0.908	668	-2.901	0.0038
<i>PesoInc</i> (peso del huevo al inicio de incubación)	0.180	668	1.087	0.2773
<i>Repetición</i> (experimento de marzo y de agosto)	3.601	3	-4.579	0.0195

Vemos que la única variable que no tiene significancia sobre el comportamiento de la respuesta del ritmo cardíaco es el peso de incubación de los huevos (Tabla 10), y todas las demás variables aportan significancia al modelo que explica la respuesta.

10.6.1.1. Efectos de las diferentes variables

Para analizar a detalle el efecto de las diferentes variables identificadas anteriormente, se subdividió la información para hacer comparaciones entre las regresiones lineales obtenidas por pares de variables.

Influencia de la etapa de desarrollo

Los análisis estadísticos para los modelos (Tabla 10) indicaron que la etapa del desarrollo tiene un efecto significativo sobre la respuesta metabólica del conjunto global de los embriones al estrés térmico. Al graficar las relaciones (Figura 50A) y la comparación entre las regresiones lineales (Tabla 11 y Tabla 12) se encontró que tanto las intersecciones como las pendientes son significativamente diferentes ($P < 0.001$) para las tres fases de desarrollo de embriones incubados previamente a 32°C. Así también las etapas en ambas repeticiones tanto de agosto como de marzo (Figura 50C y Tabla 13) son significativamente diferentes ($P < 0.001$) entre etapas. Este resultado, sin embargo, no aplica para los resultados con embriones incubados a 28°C (Figura 50B y Tabla 12) donde las dos fases manifestaron pendientes e intersecciones similares.

Tabla 11. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **etapas** (1 vs 2 y 3) en *TempInc* (32°) en el experimento de agosto.

R ²	F stat	DF	P-value
0.9375	1196	3 and 236	< 2.2e-16
ETAPAS (1-3) EN TEMPINC (32°) EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
2do vs 1er		2.743	0.006554
3er vs 1er		2.641	0.008809

significancia pendientes:			
	2do vs 1er	-3.467	0.000625
	3er vs 1er	-3.604	0.000383

Tabla 12. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **etapas** (2 vs 3) en TempInC (32°) en el experimento de agosto.

R²	F stat	DF	P-value
0.9362	926	3 and 186	< 2.2e-16
ETAPAS (2-3) EN TEMPINC (32°) EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
	3er vs 2do	-0.198	0.843
significancia pendientes:			
	3er vs 2do	-0.202	0.84

Tabla 13. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **etapas** (2 vs 3) en TempInC (32°) en el experimento de marzo.

R²	F stat	DF	P-value
0.6998	153.3	3 and 193	< 2.2e-16
ETAPAS (2-3) EN TEMPINC (32°) EN REPETICION (MARZO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
	2do vs 3er	3.937	<.001
significancia pendientes:			
	2do vs 3er	-4.457	<.001

Tabla 14. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **etapas** (2 vs 3) en TempInC (28°) en el experimento de agosto.

R²	F stat	DF	P-value
0.9375	1196	3 and 236	< 2.2e-16
ETAPAS (2-3) EN TEMPINC (28°) EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
	2do vs 3er	1.427	0.1549
significancia pendientes:			
	2do vs 3er	-1.731	0.0848

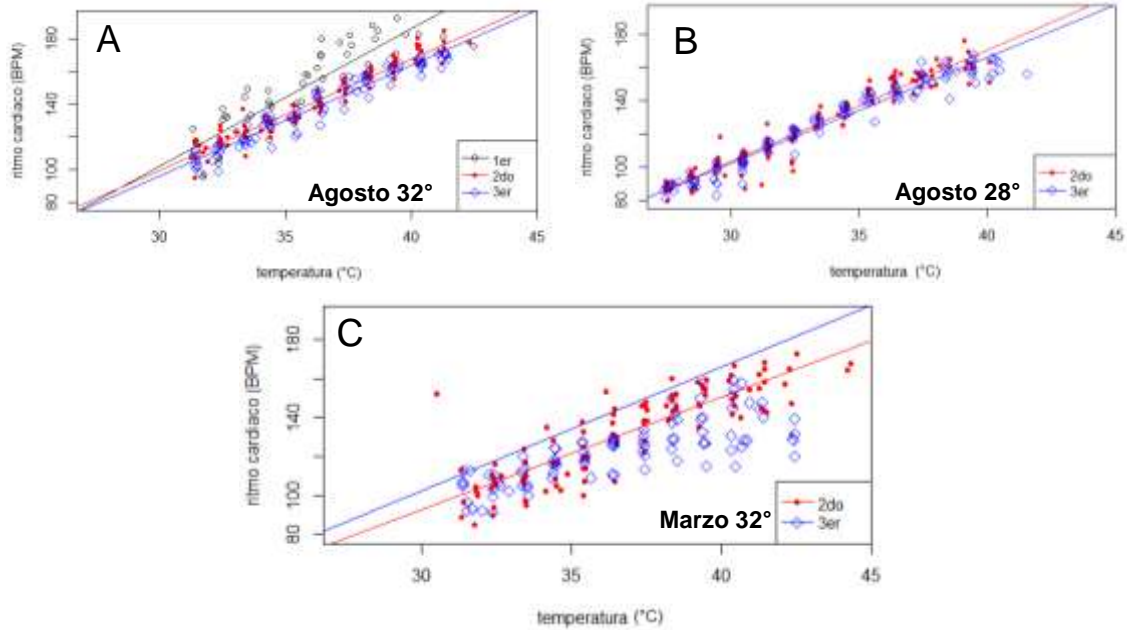


Figura 50. Regresiones para la fase lineal de la respuesta cardíaca de embriones de tortuga golfina en tres diferentes etapas: 1er, 2do y 3er tercio en repeticiones y temperaturas de incubación diferentes (A= experimento de agosto para embriones incubados previamente a 32° C; B= agosto, a 28° C; C= marzo, a 32°C).

Estos análisis reflejan la influencia significativa tanto de la etapa del desarrollo como de la temperatura de incubación previa a la experimentación. Otra manera de ilustrar este fenómeno es por medio de una comparación de las pendientes de diferentes tratamientos (temperatura de incubación, etapa y repetición) (Figura 51). Se observa que la pendiente disminuye conforme incrementa la maduración del embrión, mientras que se analice dentro de una misma temperatura de incubación. Por ejemplo, la etapa del 2do y el 3er tercio de agosto a una temperatura de 28°, la pendiente de la regresión disminuye conforme el embrión madura y esta relación del es más notoria para incubaciones de 32° respectivamente de la repetición del experimento. Resalta particularmente el cambio abrupto en la pendiente si se compara el valor de la etapa del primero respecto a las del segundo tercio.

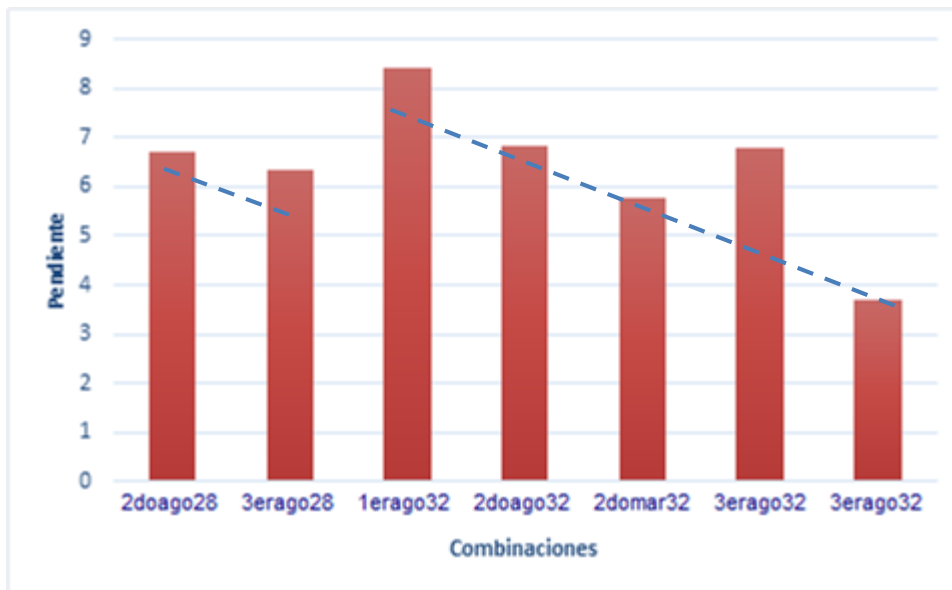


Figura 51. Comparación de valores de pendientes promedio entre tratamientos que indican un mayor incremento en la actividad cardíaca ante incrementos de temperatura entre menos desarrollado sea el embrión. 1er= primer tercio de la incubación, 2do= segundo tercio, 3er= tercer tercio; 28 y 32 = temperatura de la incubación previa; mar =experimento de marzo, ago= experimento de agosto.

Los resultados contrastantes para las etapas de desarrollo permiten confirmar nuestra hipótesis que la respuesta metabólica del embrión depende de su madurez. Hemos encontrado que particularmente en etapas tempranas (primer tercio), la sensibilidad ante estrés térmico es mayor que en las etapas tardías (segundo y tercer tercio) y por ello el embrión responde más marcadamente con incrementos de su tasa metabólica para hacer frente con los cambios ambientales.

Influencia del nido de origen

El efecto por nido de origen resultó significativo de acuerdo con los análisis estadísticos de los modelos globales (Tabla 10). Sin embargo, cuando se comparan estadísticamente las pendientes e intersecciones de las regresiones lineales dentro de los diferentes tratamientos, no se observan diferencias significativas tanto en temperaturas diferentes de incubación como para repeticiones (Tabla 15 y Tabla 23).

Tabla 15. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **nidos** (AA vs BB) en etapa (1er) en temperatura (32°) en el experimento de agosto.

R ²	F stat	DF	P-value
0.9207	194.4	3 and 47	< 2.2e-16
NIDOS (AA Y BB) EN ETAPA (1er) EN TEMPERATURA (32°) Y EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido AA vs BB		-0.221	0.8260
significancia pendientes:			
nido AA vs BB		-0.553	0.5830

Tabla 16. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **nidos** (AA vs BB) en etapa (2do) en temperatura (32°) en el experimento de agosto.

R ²	F stat	DF	P-value
0.9429	524.4	3 and 92	< 2.2e-16
NIDOS (AA Y BB) EN ETAPA (2do) EN TEMPERATURA (32°) Y EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido AA vs BB		-0.197	0.8440
significancia pendientes:			
nido AA vs BB		-0.118	0.9060

Tabla 17. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **nidos** (AA vs BB) en etapa (3er) en temperatura (32°) en el experimento de agosto.

R ²	F stat	DF	P-value
0.9401	487.3	3 and 90	< 2.2e-16
NIDOS (AA Y BB) EN ETAPA (3er) EN TEMPERATURA (32°) Y EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido AA vs BB		-0.147	0.8830
significancia pendientes:			
nido AA vs BB		-0.073	0.9420

Tabla 18. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **nidos** (AA vs BB) en etapa (2do) en temperatura (28°) en el experimento de agosto.

R ²	F stat	DF	P-value
0.9352	564.2	3 and 114	< 2.2e-16
NIDOS (AA Y BB) EN ETAPA (2do) EN TEMPERATURA (28°) Y EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido AA vs BB		1.24	0.2175
significancia pendientes:			
nido AA vs BB		-1.691	0.0935

Tabla 19. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **nidos** (AA vs BB) en etapa (3er) en temperatura (28°) en el experimento de agosto.

R ²	F stat	DF	P-value
0.9534	826.5	3 and 118	< 2.2e-16
NIDOS (AA Y BB) EN ETAPA (3er) EN TEMPERATURA (28°) Y EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido AA vs BB		1.895	0.0606
significancia pendientes:			
nido AA vs BB		-2.209	0.0291

Tabla 20. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (A vs B y C) en etapa (2do) en temperatura (32°) en el experimento de marzo.

R ²	F stat	DF	P-value
0.7325	55.23	5 and 94	< 2.2e-16
NIDOS (A, B, C) EN ETAPA (2do) EN TEMPERATURA (32°) Y EN REPETICION (MARZO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido A vs B		0.461	0.6456
nido A vs C		1.634	0.1057
significancia pendientes:			
nido A vs B		-0.479	0.6332
nido A vs C		-1.672	0.0978

Tabla 21. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (B vs C) en etapa (2do) en temperatura (32°) en el experimento de marzo.

R ²	F stat	DF	P-value
0.707	62.93	3 and 74	< 2.2e-16
NIDOS (B, C) EN ETAPA (2do) EN TEMPERATURA (32°) Y EN REPETICION (MARZO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido B vs C		1.303	0.1970
significancia pendientes:			
nido B vs C		-1.33	0.1880

Tabla 22. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (A vs B y C) en etapa (3er) en temperatura (32°) en el experimento de marzo.

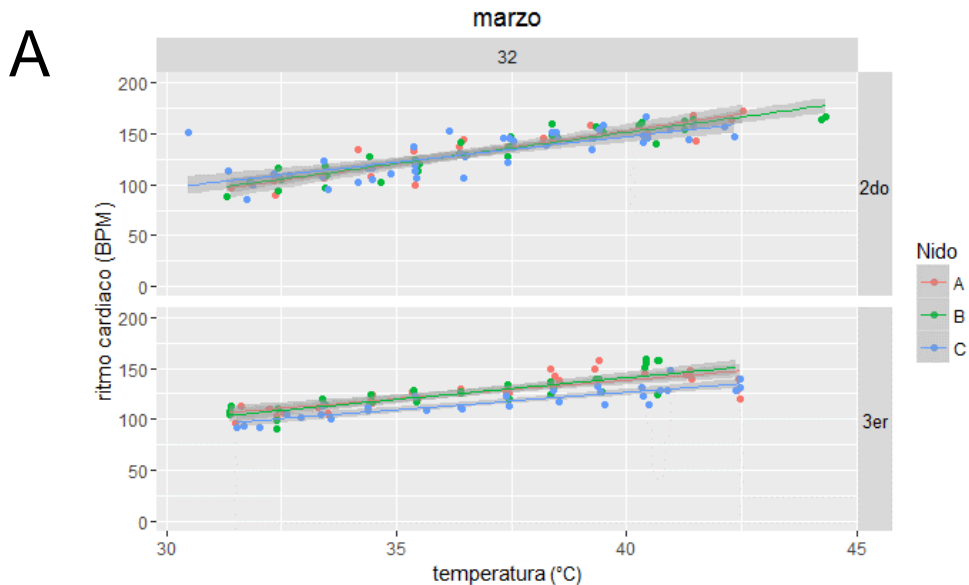
R ²	F stat	DF	P-value
0.6934	44.41	5 and 91	< 2.2e-16
NIDOS (A, B, C) EN ETAPA (3er) EN TEMPERATURA (32°) Y EN REPETICION (MARZO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido A vs B		-0.894	0.3740
nido A vs C		-0.164	0.8700
significancia pendientes:			

nido A vs B	0.912	0.3640
nido A vs C	-0.305	0.7610

Tabla 23. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para nidos (B vs C) en etapa (3er) en temperatura (32°) en el experimento de marzo.

R ²	F stat	DF	P-value
0.7304	56.1	3 and 58	< 2.2e-16
NIDOS (B, C) EN ETAPA (3er) EN TEMPERATURA (32°) Y EN REPETICION (MARZO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
nido B vs C		0.76	0.4505
significancia pendientes:			
nido B vs C		-1.262	0.2119

A pesar de que no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos, se observa que en el experimento de marzo la pendiente de la regresión del nido C para el 3er tercio está por debajo del nido A y B (Figura 52A), lo mismo sucede para el nido AA en el tratamiento de agosto, el cual en ambas temperaturas de incubación y en todas las etapas de esa repetición la pendiente de la regresión siempre está por arriba del nido BB (Figura 52B). Esto nos sugiere que los embriones del nido AA y nido C nido AA tienen una mayor susceptibilidad ante el estrés térmico aplicado.



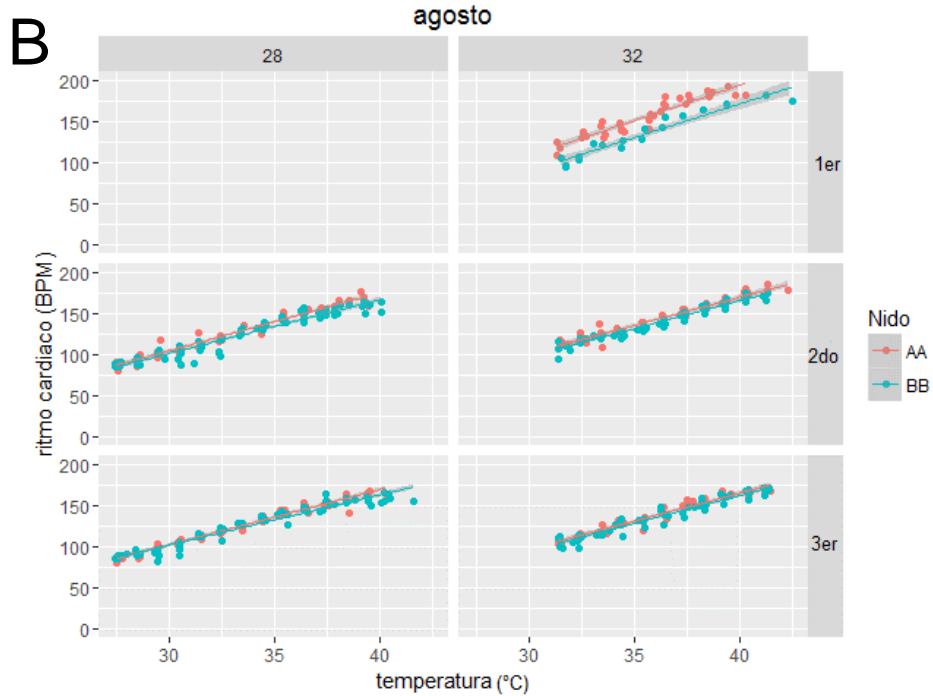


Figura 52. Fase lineal del ritmo cardíaco (latidos por minuto) de embriones de tortuga golfina en tres tercios del desarrollo (1er, 2do, 3er), dos repeticiones: A= marzo con tres nidos (A, B, C) y B= agosto con dos nidos (AA y BB) sometidos a calentamiento continuo a partir de dos temperaturas de incubación previa (28° o 32° C, columnas).

10.6.1.2. Influencia de la repetición (marzo o agosto)

El efecto por repetición, es decir si el experimento se realizó en el mes de marzo o agosto del 2016, resultó significativo en ambas etapas trabajadas (2do y 3er) a la misma temperatura de incubación (32°C) (Tabla 24 y Tabla 25). Este resultado tan contrastante entre repeticiones se debe a que en marzo se obtuvieron datos con mucha variación y además se hicieron las primeras pruebas con el uso del monitor cardíaco y no teníamos aún una buena experiencia en su funcionamiento sino fue hasta agosto de ese mismo año cuando se repitió el experimento y que se refleja en un mejor ajuste de los datos (Figura 52) debido a que ya teníamos experiencia con el manejo del monitor. Por lo que los datos de marzo se tomaron en cuenta como un ensayo previo a la prueba experimental que se realizó en agosto y que en el análisis de la respuesta completa se detallan las causas.

Tabla 24. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **repeticiones** (agosto vs marzo) en etapa (2do) en temperatura (32°).

R ²	F stat	DF	P-value
0.8344	328.4	3 and 192	< 2.2e-16
REPETICION (MARZO Y AGOSTO) EN ETAPA (2do) EN TEMPERATURA (32°)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
agosto vs marzo		1.674	0.0957
significancia pendientes:			
agosto vs marzo		-2.571	0.0109

Tabla 25. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para **repeticiones** (agosto vs marzo) en etapa (3er) en temperatura (32°).

R ²	F stat	DF	P-value
0.8385	329.8	3 and 187	< 2.2e-16
REPETICION (MARZO Y AGOSTO) EN ETAPA (3er) EN TEMPERATURA (32°)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
agosto vs marzo		6.979	<.001
significancia pendientes:			
agosto vs marzo		-8.32	<.001

Influencia de la temperatura de incubación

Los análisis estadísticos para indagar si hay influencia de la temperatura de incubación sobre la respuesta metabólica de los embriones indicaron que no hay diferencias significativas (Tabla 26) entre tratamientos del 2do tercio. Sin embargo, se nota una ligera significancia para la etapa del 3er tercio de la repetición de agosto (Tabla 27).

Tabla 26. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para temperaturas de incubación (28° vs 32°) en etapa (2do) en el experimento de agosto.

R ²	F stat	DF	P-value
0.9355	1030	3 and 210	< 2.2e-16
TEMPERATURA (28 Y 32) EN ETAPA (2do) EN REPETICION (AGOSTO)			
significancias intersecciones:		T-value	P-value
28° vs 32°		-0.798	0.4260
significancia pendientes:			
28° vs 32°		0.452	0.6520

Tabla 27. Estadística inferencial de la comparación entre las regresiones lineales para temperaturas de incubación (28° vs 32°) en etapa (3er) en el experimento de agosto.

R ²	F stat	DF	P-value
0.9484	1318	3 and 212	< 2.2e-16

TEMPERATURA (28 Y 32) EN ETAPA (3er) EN REPETICION (AGOSTO)		
significancias intersecciones:	T-value	P-value
28° vs 32°	-2.455	0.0149
significancia pendientes:		
28° vs 32°	1.96	0.0513

Estos resultados los podemos comprobar si nos enfocamos en una misma etapa, ya sea 2do o 3er tercio sobre el experimento de agosto (Figura 52B), donde vemos que entre las regresiones de los datos de embriones para ambas temperaturas de incubación no hay diferencias legibles.

10.6.1.3. Influencia del peso del huevo

Debido a las grandes diferencias observadas en la biometría de los huevos provenientes de los dos nidos muestreados (Figura 53A) se pensaba que las dimensiones de los huevos podrían reflejar la existencia de embriones con marcadas diferencias en su capacidad metabólica.

Para evaluar esta posible correlación se compararon los pesos de los huevos contra los coeficientes de las regresiones lineales para la relación entre ritmo cardíaco y temperatura (Figura 53B). Este análisis indicó que, si bien hay diferencias sobresalientes en el peso de los huevos y también entre los coeficientes de las regresiones derivadas para los distintos embriones, no se observa una correspondencia entre el peso del huevo y los coeficientes.

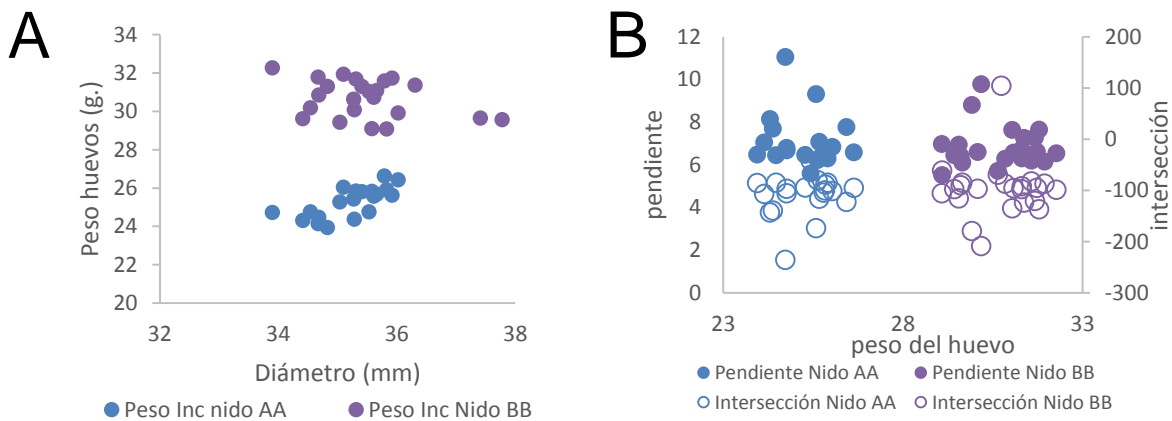


Figura 53. Correlación negativa entre biometrías de huevos (diámetros vs pesos) y coeficientes de las regresiones (pendiente: eje Y izquierdo e intersección: eje Y derecho) en función del peso de los huevos analizados para los dos nidos (AA y BB).

No obstante lo anterior, si se grafican los promedios de los pesos de los huevos por nido contra los promedios de las pendientes de las regresiones (Figura 54) se puede observar una tendencia con buen ajuste ($R^2 = 0.71$). Debido a la gran variación de los datos, particularmente para el experimento de marzo (nidos A-C) esta relación tiene poco apoyo estadístico.

La contribución del peso del huevo es visible para los distintos nidos, ya que huevos más pequeños corresponden con pendientes más empinadas. Es posible que los huevos más pequeños, al ser menores en tamaño, presenten un menor volumen y los cambios de temperatura al interior del huevo durante el experimento sean más bruscos que para huevos de mayor tamaño. Esto sugiere que embriones más pequeños o con menor peso tienden a ser más vulnerables frente al calentamiento, mientras que embriones con pesos mayores logran resistir más las temperaturas elevadas y esto se ve reflejado en su metabolismo.

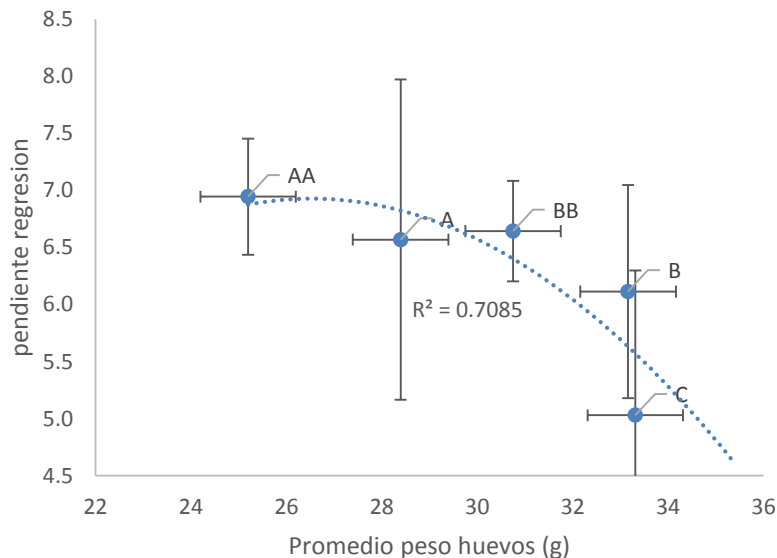


Figura 54. Relación entre los valores promedio por nido de peso de los huevos y la pendiente de regresión lineal de su tolerancia a incrementos de temperatura. Las barras de error representan los errores estándar para las dos medidas en cada uno de los nidos en segundo tercio del desarrollo embrionario en incubaciones de 32°C.

Influencia de embriones individuales

La influencia por embriones individuales, se analizó usando el identificador de cada embrión como variable categórica (**idhuevo**). Si hubiera comportamientos distintos, encontraríamos diferentes tendencias en la respuesta para cada embrión. Cuando se grafican los resultados por huevo (Figura 55) se aprecian algunas diferencias, pero no son

consistentes y los valores de R^2 de las regresiones lineales no mejoran el valor de la regresión con el cúmulo de datos.

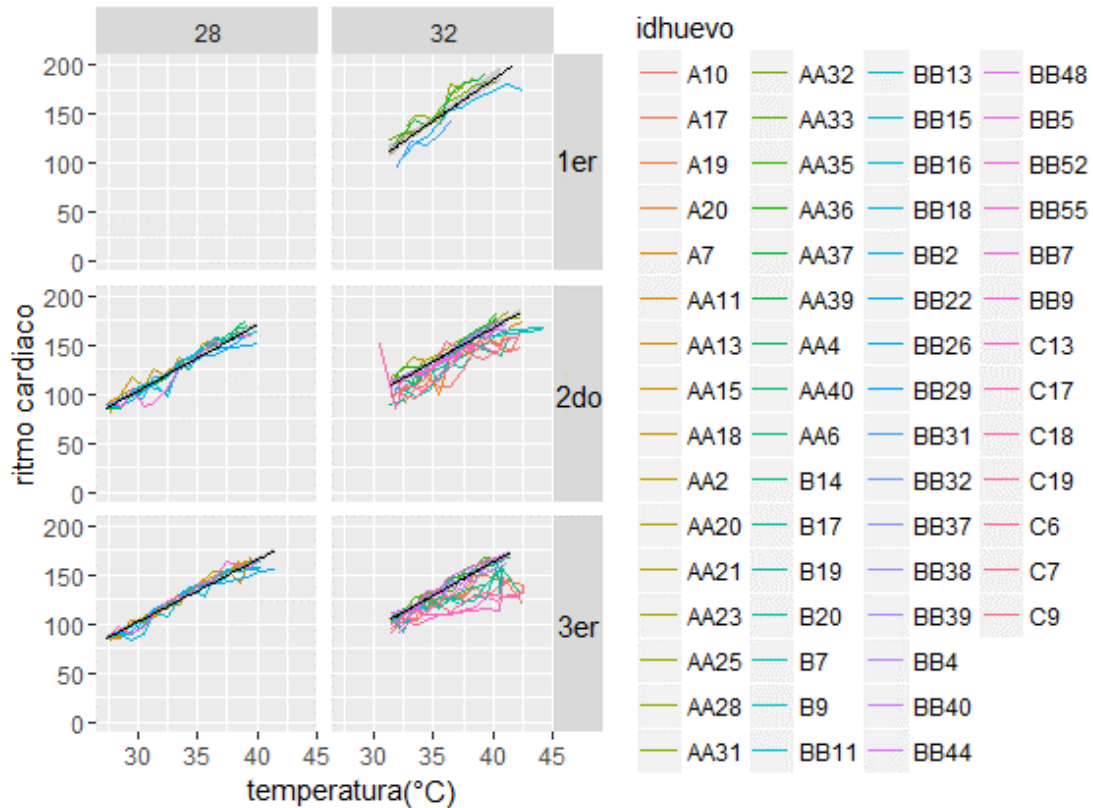


Figura 55. Regresiones lineales de las lecturas de ritmo cardíaco por huevo y por temperatura de incubación en los diferentes tercios muestreados en la repetición de agosto.

Tasa metabólica en la fase lineal

Las regresiones de la fase lineal de la respuesta en el ritmo cardíaco permiten extrapolar valores para calcular un análogo del coeficiente Q_{10} con el cual podemos comparar resultados entre tratamientos e incluso con otros trabajos usando un parámetro ampliamente aplicado. En este caso usamos los resultados de las regresiones para los tratamientos de incubación a 32°C para el cual se logró muestrear los tres tercios a lo largo del desarrollo embrionario. El coeficiente de temperatura Q_{10} es muy usado en fisiología y mide el cambio a las tasas de alguna función en un sistema biológico o químico como consecuencia de incrementar la temperatura 10°C.

Tabla 28. Obtención del coeficiente de temperatura Q_{10} para comparar tasa metabólica entre tratamientos.

Fa	Intersección	Pendiente	Q_{10}
2doago28	-97.8	6.7	1.57
3erago28	-87.3	6.3	1.55
1erago32	-150.1	8.4	1.71
2doago32	-105.4	6.8	1.60
2domar32	-80.1	5.8	1.55
3erago32	-107.3	6.8	1.62
3ermar32	-12.0	3.7	1.35
<i>S. undulatus</i>	-147.7	9.0	1.64

Los valores de Q_{10} resaltan las mismas diferencias entre fases de desarrollo que las que se presentaron anteriormente, con los valores máximos para las fases iniciales del desarrollo y los mínimos para embriones del tercer tercio del desarrollo.

Comparando los valores de Q_{10} para nuestros embriones de tortugas marinas con los del trabajo de Angilletta *et al.* (2013) que usaron un protocolo experimental similar para embriones de lagartija *Sceloporus undulatus* a lo largo del período de incubación, es interesante que el incremento en tasas metabólicas por un aumento de 10°C es mayor en embriones de tortuga marina en el primer tercio de su desarrollo que el de los embriones de lagartija pero es similar en el segundo tercio y es menor en embriones en su último tercio de desarrollo. Esto, por lo menos en esta fase inicial de la respuesta al estrés térmico. En la siguiente sección se analiza el patrón completo de la tolerancia en los embriones respecto a la gama completa de temperaturas aplicadas en donde las diferencias son mayores entre embriones de tortugas marinas y lagartijas.

10.6.2. Análisis de la respuesta completa en el ritmo cardíaco

Para describir el comportamiento entero del ritmo cardíaco, se construyeron modelos generalizados aditivos (*gam*) con las rutinas **bblme** dentro de la librería **mgcv** del paquete estadístico R (Versión 3.3.2). Al igual que en los modelos lineales en la anterior sección, nuestra variable de respuesta fue el **ritmo cardíaco** promedio (*promBPM*), la cual se analizó en función de la variable explicativa **temperatura** (*TempPromAjustada*). De igual manera se evaluó el efecto de la temperatura de incubación, etapa de desarrollo, peso del huevo, nido de origen y la repetición del experimento como variables explicativas.

El modelo más factible y que tuvo un mejor ajuste corresponde a aquel cuyo valor AIC=9332. Este modelo nos describe los valores de ritmo cardíaco (*promBPM*) en función de la temperatura (*TempPromAjustada*) y de algunas de nuestras variables categóricas tales como: *Repeticion*, *Nido*, *Etapa* y *Temperatura de Incubación*. Además de acuerdo con los análisis estadísticos dichas variables contribuyen significativamente (Tabla 29) a la respuesta metabólica de ritmo cardíaco del registro completo de ambos periodos muestreados, con excepción de la variable *Nido* que da un resultado no significativo, y por tanto no contribuye con nuestra respuesta.

Tabla 29. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales para el conjunto de datos de agosto y marzo.

Modelo		R ²	AIC
<pre>gam, mod11 <- gam(promBPM ~ s(TempPromAjustada) + s(Repeticion, bs="re") + s(Nido, bs="re") + s(Etapa, bs="re") + s(TempInc, bs="re"), method="REML", data = dat)</pre>		0.723	9332.089
<i>Estadísticas inferenciales</i>			
Effect	Effect d.f.	F	P-value
Repeticion	0.8742	98.175	0.0049
Nido	2.0762	2.823	0.1049
Etapa	1.8923	35.151	< 0.001
TempInc	0.9139	51.3	0.0007

De la misma manera que ocurrió en la fase lineal, las repeticiones de agosto y de marzo son diferentes en ambos periodos de muestreo. Por ello, se desarrollaron modelos por separado con lo cual se obtuvo un mejor ajuste considerando únicamente los datos de agosto debido a que son datos más confiables y esto lo podemos observar en gráficas anteriores donde se nota que hay un mayor ajuste. Al contrario que los datos de marzo que son mucho más dispersos.

El modelo con mejor ajuste tomando en cuenta sólo los datos de agosto mostró un valor de AIC=6632, el cual muestra que variables como la *TempInc* y *Etapa* contribuyen significativamente (Tabla 30) y que explican independientemente la respuesta del ritmo cardíaco de nuestros embriones en función de la temperatura (*TempPromAjustada*).

Tabla 30. Modelo con mejor ajuste y sus estadísticas inferenciales para variables independientes del conjunto de datos de agosto.

Modelo		R ²	AIC
<pre>gam.mod6 <- gam(promBPM ~ s(TempPromAjustada)+s(TempInc, bs="re")+s(Etapa, bs="re"), method="REML", data = ago)</pre>		0.764	6632.999
<i>Estadísticas inferenciales</i>			
Effect	Effect d.f.	F	P-value
TempInc	0.9071	19.16	0.0011
Etapa	1.8961	19.04	<.001

Para validar el modelo y visualizar el efecto de la variable *Etapa* se construyó una gráfica usando una regresión binomial por el método *stat_smooth* del paquete *ggplot2* en el ambiente R, que resalta la fuerte influencia de la temperatura de incubación y la etapa sobre el ritmo cardíaco de los embriones. Esto es, a una temperatura de incubación de 32°C los valores basales de ritmo cardíaco son mayores que en una incubación a 28°C (Figura 56, ①). De igual forma, en incubación con la mayor temperatura se registraron valores máximos de ritmo cardíaco mayores que a menor temperatura (Figura 56, ②) y por tanto los valores de temperatura donde se registra el máximo cardíaco (Figura 56, flechas amarillas) también fueron mayores. No se encontraron diferencias en los valores de temperatura donde cesa el corazón, es decir tanto a una incubación de 28° como de 32°C los valores son los mismos (Figura 56, flechas rojas) donde sufren paro cardíaco los embriones.

En general, para embriones del 2do tercio como del 3er tercio alcanzan temperaturas similares cuando sus lecturas marcan ceros, es decir cuando sufren un paro cardíaco. Sin embargo, a una temperatura de 32° parece que los embriones del 2do tercio resisten un poco más que embriones del 3er tercio, mientras que para una temperatura de incubación de 28° no se logra distinguir diferencias de temperaturas donde ocurre el paro cardíaco, ya que los intervalos de confianza se traslapan sugiriendo que las diferencias en la respuesta no difiere entre una etapa y otra (Figura 56). Los valores máximos de ritmo cardíaco en promedio son mayores en etapas provenientes de 32° C. No obstante, la aparición de estos valores máximos de ritmo cardíaco varía en cada temperatura de incubación ya que se presentan a diferente temperatura de calentamiento, ya que valores máximos de hasta 180LPM se dan en un promedio de 40-41°C para embriones de 32°C mientras que valores

promedio de 170LPM se presentan en embriones a una temperatura experimental de 28°C (Figura 56).

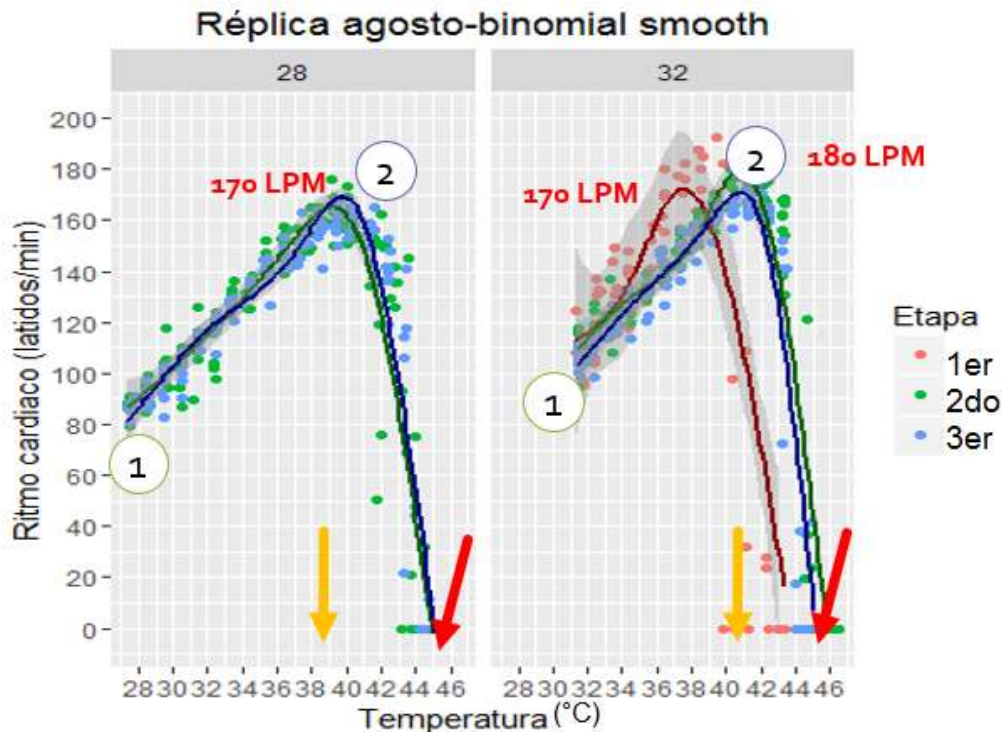


Figura 56. Cambios en ritmo cardíaco (latidos por minuto) de embriones de tortuga golfina en tres tercios del desarrollo (1er, 2do, 3er) sometidos a calentamiento continuo a partir de la temperatura de incubación previa (28° o 32°C columnas).

Para analizar el efecto de las temperaturas de incubación se seleccionó otro modelo que describe el ritmo cardíaco (*promBPM*) en función de la temperatura (*TempPromAjustada*) y usando la instrucción “*by*” en el ambiente R, para evaluar la interacción entre dos variables categóricas: Etapa y Temperatura de incubación (Tabla 31). El resultado indicó que la interacción entre *Etapa* y *TempInc* a 32° es significativa. En este caso indica que etapas dentro de temperatura ejercen una influencia significativa, pero solamente dentro de las incubaciones de 32°C ya que dentro de la incubación a 28° no es significativa.

Tabla 31. Modelo con mejor ajuste para interacción entre variables y sus estadísticas inferenciales del conjunto de datos de agosto.

Modelo	R ²	AIC
<pre>gam.mod15 <- gam(promBPM ~ s(TempPromAjustada)+s(Etapa, by =TempInc, bs="re"), method="REML", data = ago)</pre>	0.766	6627.604

<i>Estadísticas inferenciales</i>			
Effect	Effect d.f.	F	P-value
Etapa:TempInc28	0.0010	0	0.4380
Etapa:TempInc32	2.6950	10.93	0.0000

Por otro lado, dado que *Nido* es una variable que no contribuye significativamente a la respuesta del ritmo cardíaco (Tabla 29) y que además en los datos de agosto hay una significancia alta en relación a la variable *Etapa*. Por esto se realizó otro modelo para analizar la contribución de dichas variables a la respuesta del ritmo cardíaco en función de la temperatura (*TempPromAustada*).

El modelo con mejor ajuste (AIC=3446) sugiere que la variable *Nido* no es significativa (Tabla 32) y por tanto no contribuye al comportamiento de la respuesta del ritmo cardíaco por lo que se considera un factor independiente.

Tabla 32. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales para el conjunto de datos de agosto a una temperatura de 32°C.

Modelo	R ²	AIC	
gam.mod2 <- gam(promBPM ~ s(TempPromAjustada)+s(Etapa, bs="re")+s(Nido, bs="re"), method="REML", data = ago32)	0.666	3446.812	
<i>Estadísticas inferenciales</i>			
Effect	Effect d.f.	F	P-value
Etapa	1.8242	9.4980	<.001
Nido	0.4319	0.8390	0.1850

Sin embargo, cuando se considera la variable *Nido* dentro de la variable *Etapa* el modelo con mejor ajuste sugiere que los nidos durante los dos primeros tercios de desarrollo tuvieron una influencia significativa (Tabla 33), mientras que en una etapa madura la variable nido no manifestó un efecto significativo.

Tabla 33. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales con interacción entre Nido y Etapa del conjunto de datos de agosto a una temperatura de 32° C.

Modelo		R ²	AIC
<pre>gam.mod3 <- gam(promBPM ~ s(TempPromAjustada)+s(Nido, by =Etapa, bs="re"), method="REML", data = ago32)</pre>		0.665	3449.011
<i>Estadísticas inferenciales</i>			
Effect	Effect d.f.	F	P-value
Nido: Etapa1er	1.6284	5.0780	0.0046
Nido: Etapa2do	1.4675	2.9970	0.0324
Nido: Etapa3er	0.0006	0.0000	0.5458

En el primer tercio de desarrollo se distingue claramente que la pendiente es mucho mayor y abrupta del nido AA con respecto a la pendiente del nido BB en una incubación de 32° C (Figura 57) y que además las pendientes para el nido AA siempre están por arriba de las pendientes del nido BB. Esto sugiere que el nido AA muestra una mayor susceptibilidad ante el estrés térmico aplicado. Para etapas maduras no es muy clara la diferencia entre el comportamiento de un nido y otro, por lo menos dentro de mismas temperaturas de incubación. Por tanto, entre mayor avanzada sea la etapa de desarrollo, menos abrupta será su respuesta ante la exposición a temperaturas agudas y eso se ve reflejado en la respuesta de embriones pertenecientes al primer tercio, los cuales aceleran su tasa metabólica para mitigar los cambios de temperatura reflejándose en una pendiente mucho más abrupta en comparación con embriones de etapas más avanzadas.

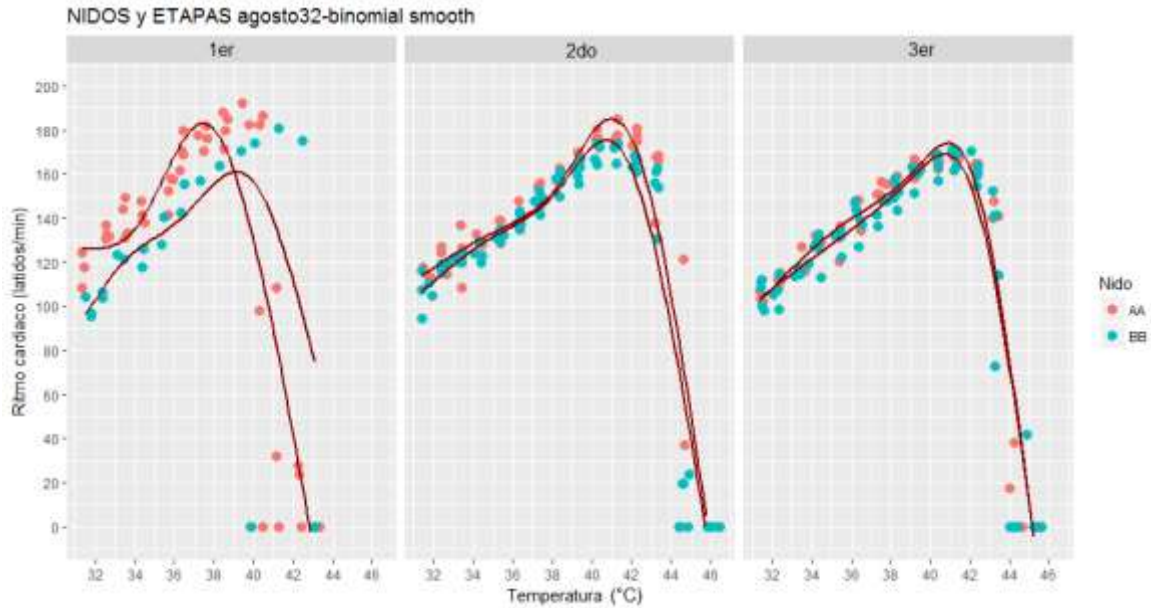


Figura 57. Comparaciones de ritmo cardíaco entre las tres fases de desarrollo de embriones de tortuga golfina correspondientes a dos nidos dentro de una misma temperatura (32°C).

Para evaluar el efecto de la variable *Nido* se construyó otro modelo anidando la variable *Nido* dentro de *Etapa*. El resultado (Tabla 34) nos indica que el nido AA manifiesta un comportamiento distinto cuando se compara entre etapas (ver Figura 57) mientras que para el nido BB no hay diferencias significativas.

Tabla 34. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales para el conjunto de datos de agosto de un tratamiento a 32°C anidando por nido.

Modelo		R ²	AIC
<pre>gam.mod4 <- gam(promBPM ~ s(TempPromAjustada)+s(Etapa, by =Nido, bs="re"), method="REML", data = ago32)</pre>		0.664	3451.366
<i>Estadísticas inferenciales</i>			
Effect	Effect d.f.	F	P-value
Etapa: NidoAA	2.242	4.599	0.0038
Etapa: NidoBB	1.456	1.179	0.1183

En este mismo análisis del conjunto de datos de agosto, resultaron algunos modelos con que nos ayudaron a explicar por qué la variable *PesoInc* no es significativa (Tabla 35). Al anidar los valores de peso individual de los huevos (*PesoInc*) dentro de la variable

categoría *Nido*, resultó que la interacción no contribuye de manera significativa y por tanto son otros los factores que le confieren en algunos casos a la variable *Nido*.

Tabla 35. Modelo de buen ajuste y estadísticas inferenciales para la interacción entre la variable *Nido* y *PesoInc* para el conjunto de datos de agosto.

Modelo		R ²	AIC
<pre>gam.mod21 <- gam(promBPM ~ s(TempPromAjustada)+s(Nido, by =PesoInc, bs="re"), method="REML", data = ago)</pre>		0.755	6656.441
<i>Estadísticas inferenciales</i>			
Effect	Effect d.f.	F	P-value
Nido:PesoInc	0.0005	0	0.871

Aun haciendo la anidación en el modelo en el otro sentido (anidado *Nido* dentro de *PesoInc*) se obtiene un efecto no significativo (Tabla 36), corroborando que el peso de los nidos al inicio de la incubación no influye sobre la repuesta del ritmo cardíaco aún en diferentes nidos.

Tabla 36. Modelo con mejor ajuste y estadísticas inferenciales para el conjunto de datos de agosto y marzo.

Modelo		R ²	AIC
<pre>gam.mod22 <- gam(promBPM ~ s(TempPromAjustada)+s(PesoInc, by =Nido, bs="re"), method="REML", data = ago)</pre>		0.755	6656.441
<i>Estadísticas inferenciales</i>			
Effect	Effect d.f.	F	P-value
PesoInc:NidoAA	0.0003	0	0.8730
PesoInc:NidoBB	0.0007	0	0.8660

Límites térmicos del rendimiento cardíaco: temperaturas críticas de máximo ritmo cardíaco y paro cardíaco

De manera general, el calentamiento desde la temperatura basal de incubación (32° o 28°C), ocasionó incrementos en el ritmo cardíaco hasta temperaturas promedio de 40-41°C donde se obtuvieron los rendimientos máximos, alcanzando promedios los 170-180 LPM

para embriones provenientes de una incubación de 32°C mientras que para la incubación de 28°C fue un rendimiento máximo de 160 LPM en promedio. El calentamiento adicional causó que las tasas cardíacas se estabilizarán levemente para luego caer bruscamente hasta ocurrir un paro cardíaco a temperaturas entre 44-45°C tanto para embriones incubados a 32° como para los de 28°C (Figura 58 y Figura 59).

Se identificaron las temperaturas bajo calentamiento agudo a las que se observaron los valores máximos de ritmo cardíaco (TRCmax) y el paro cardíaco (TPC) a partir de los registros gráficos de los experimentos utilizando los valores observados (rango) y el valor máximo del ajuste por regresión binomial (librería **splines** en el ambiente R (Figura 58, Figura 59 y Tabla 37).

Para embriones en el 1er tercio con incubación de 32°C hay algunos que no resistieron el calentamiento y de manera muy abrupta cae su ritmo cardíaco casi desde el inicio. Para la incubación de 28° no se trabajó con embriones en la 1er etapa, ya que como vimos son organismos muy inmaduros y por tanto muy sensibles. No obstante el análisis de los resultados permitió identificar valores de los parámetros críticos: temperatura de ritmo cardíaco máximo 37.5°C con un promedio de 172 LPM y la temperatura en donde sucede el paro cardíaco 44°C.

Comparando entre etapas del 2do tercio, pero a diferente temperatura de incubación, los valores TRCmax son alcanzados a mayores temperaturas en una incubación de 32°C comparada con la de 28° (38-42.5°C) alcanzando 180 LPM en promedio a 41°C. Lo mismo ocurre cuando nos enfocamos en la etapa del último tercio con lo mencionado anteriormente (39-41.5° C alcanzando los 162 LPM). Sin embargo un punto a resaltar es que en las etapas más inmaduras los valores máximos de ritmo cardíaco son mayores comparados con los de etapas más maduras (172 LPM en promedio para 1er tercio y 168 LPM en promedio para 3er tercio) (Ver Figura 58). A pesar de que los resultados del experimento de marzo son más variables parece que ocurre lo mismo.

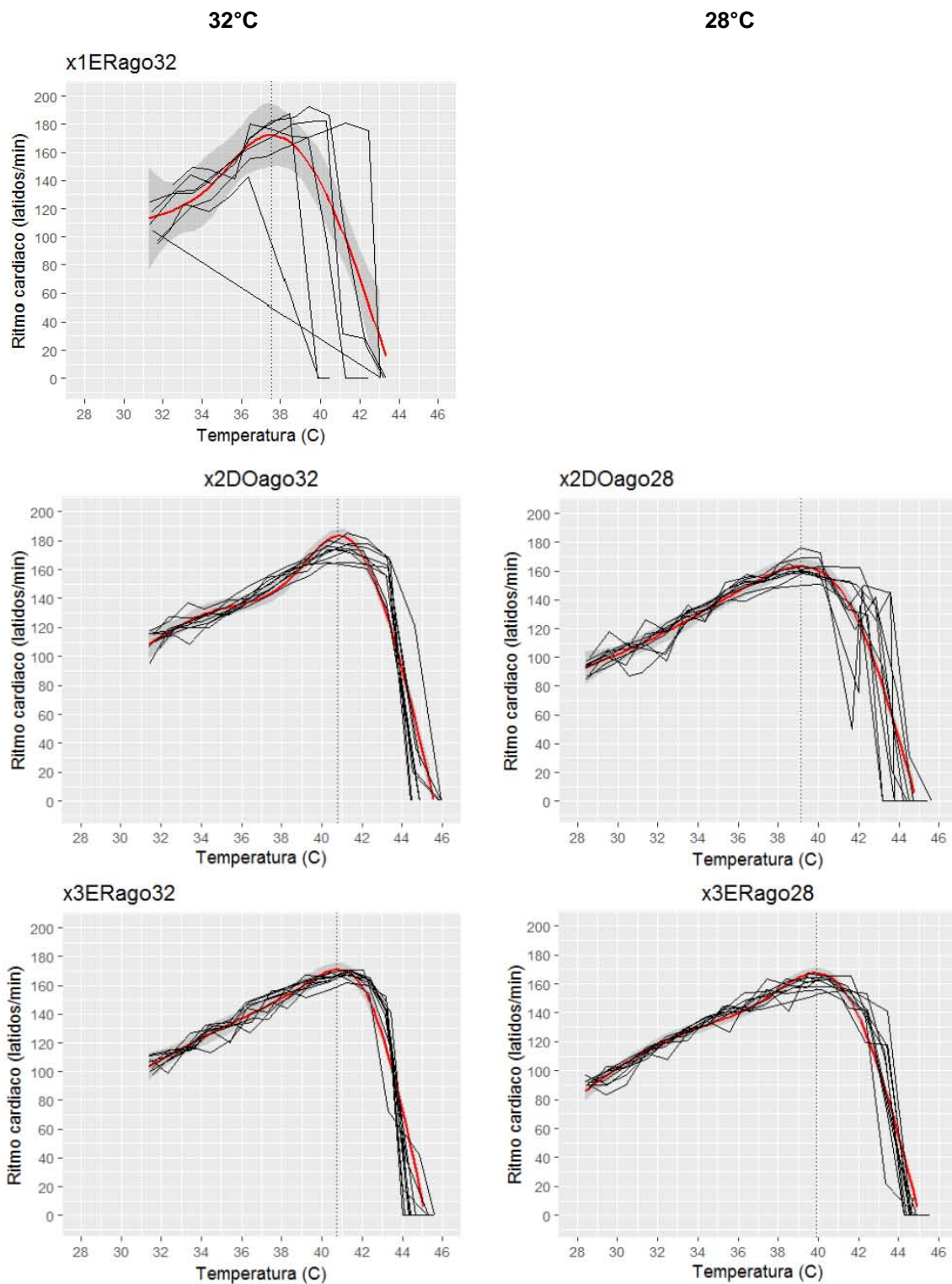


Figura 58. Identificación de valores máximos de ritmo cardíaco. Valores de ritmo cardíaco (LPM) de embriones de tortuga golfinia incubados a dos temperaturas (32°C=columna izquierda; 28°C=columna derecha) en agosto. Valores máximos de LPM (línea punteada) en temperaturas entre 37-41°C y posteriormente caen bruscamente entre 43-46°C. Cada línea negra representa la trayectoria de la tasa cardíaca para un solo embrión. Las líneas rojas representan relaciones estimadas a partir del modelo general aditivo mixto con mejor ajuste.

No obstante, en el muestreo de marzo los valores máximos de ritmo cardíaco son menores (promedio de 155 LPM) comparados con los de embriones muestreados en agosto y el paro cardíaco se da en temperaturas un poco mayores (promedio de 45°-46°C) con respecto a las de agosto. A pesar de que en marzo no se tiene un muestreo en temperaturas de incubación menores a 32°, se puede ver que la tendencia tanto en agosto como en marzo (Figura 59), embriones maduros toleran temperaturas mayores de calentamiento, lo cual se demuestra cuando se observa que los valores de frecuencia cardíaca son menores que los valores de LPM de embriones en etapas inmaduras.

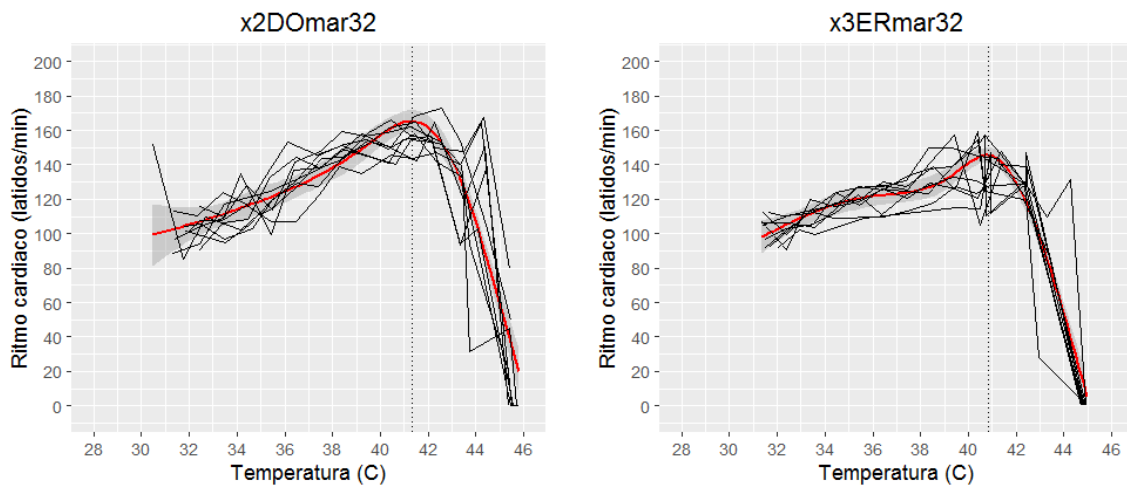


Figura 59. Identificación de valores máximos de ritmo cardíaco. Valores de ritmo cardíaco (LPM) de embriones de tortuga golfina incubados a 32°C en marzo. Valores máximos de LPM (línea punteada) en temperaturas entre 40-41.5°C y posteriormente caen bruscamente entre 44-46°C. Cada línea negra representa la trayectoria de la tasa cardíaca para un solo embrión. Las líneas rojas representan relaciones estimadas a partir del modelo general aditivo mixto con mejor ajuste.

Tabla 37. Resumen de valores para parámetros críticos: Los valores para la frecuencia cardíaca basal previo al inicio de incrementos en temperatura, las temperaturas máximas para valores máximos de ritmo cardíaco (TRCmax) y paro cardíaco (TPC) en embriones de tortuga golfina fueron derivados de los valores observados (rango) y el valor máximo del ajuste por regresión binomial usando la librería **splines en el ambiente R**.

Código	Temperatura de incubación (°C)	Etapa (tercio)	Ritmo cardíaco basal (rango)	Ritmo cardíaco basal (regresión)	Ritmo cardíaco max (rango)	Ritmo cardíaco max (regresión)	TRCmax (rango)	TRCmax (regresión)	Tiempo a Ritmo cardíaco max (hr) (rango)	TPC (rango)	TPC (regresión)
2domar32	32	2do	85-110	100	160-170	165	41-42.5	41.34	7.0-8.0	46-47	46.3
3ermar32	32	3er	90-110	98	140-150	145	40.5-41.5	40.85	6.0-7.0	45-46	45.3
2doago28	28	2do	80-100	92	155-170	165	38-40	39.18	7.0-8.0	44.5-45.5	44.9
3erago28	28	3er	80-100	87	160-170	168	39-40.5	39.83	8.0-9.0	44.5-45.5	45.1
1erago32	32	1er	90-130	114	150-190	172	36.5-38.5	37.55	4.0-5.0	43-45	44
2doago32	32	2do	100-120	110	175-185	183	40-41.5	40.75	6.0-7.0	45-46	45.8
3erago32	32	3er	90-115	104	165-175	171	40.5-41.5	40.74	6.0-7.0	45-45.5	45.2

10.7. Comparación de nuestros resultados para tortuga golfina contra los de un reptil terrestre

Debido a que este tipo de estudio nunca había sido realizado con tortugas marinas y el hecho que los rangos de temperatura aplicados y bajo los cuales los embriones mantuvieron su capacidad metabólica sin fallecer rebasa por mucho las temperaturas actualmente consideradas como letales para tortugas marinas (34-35°C) se consideró útil el comparar nuestros resultados con los de embriones de lagartijas que fueron estudiados a lo largo del período de incubación por Angilletta *et al.* (2013). Esta comparación se hace con la intención de comprender cómo la respuesta del ritmo cardíaco en embriones de lagartijas bajo incrementos de temperatura como los que se usaron aquí se compara con los límites de tolerancia en organismos en condiciones naturales o incluso los rangos de temperaturas en el ambiente de nido en esta especie. Se supone que por lo menos las capacidades de tolerancia térmica en un reptil terrestre deben ser mucho mayores debido a que su ambiente natural se caracteriza por temperaturas más elevadas además de experimentar cambios más bruscos.

Aunque Angilletta *et al.* (2013) no evaluaron diferentes etapas del desarrollo embrionario como nosotros, si registran que los valores de temperatura tolerados por los embriones de las lagartijas rebasan por mucho los valores máximos típicamente encontrados en su ambiente natural (20-35°C) y, además, las temperaturas correspondientes a los máximos valores de ritmo cardíaco (44-47°C) rebasan las temperaturas a las que lagartijas en fase adulta son inmovilizadas (*ibid*).

De manera similar, los valores para las temperaturas de máximo ritmo cardíaco en embriones de tortugas (37.5°C para el 1er tercio; 42-43°C para 2do y 3er tercios) son mucho mayores que los valores considerados letales para incubaciones de huevos en tortugas marinas.

No obstante, en los embriones de lagartijas tanto los valores de ritmo cardíaco son más elevados a lo largo del proceso de tolerancia térmica, como los valores de temperaturas experimentales más elevadas cuando se da el paro cardíaco. Esto se atribuye a que son especies terrestres y los cambios ambientales y los intervalos de temperatura en nidos de reptiles terrestres son más drásticos por lo que desarrollan mecanismos fisiológicos o metabólicos para soportar valores mucho más altos de temperaturas.

Si comparamos los valores del coeficiente de temperatura Q_{10} (Tabla 28), encontramos mayores similitudes, guardando las diferencias en las magnitudes de las temperaturas

mencionadas en el párrafo anterior. Desde este punto de vista, solo los incrementos en el ritmo metabólico en el 1er tercio fueron mayores en tortugas marinas, mientras que en el 2do y 3er tercio fueron muy similares que los de las lagartijas.

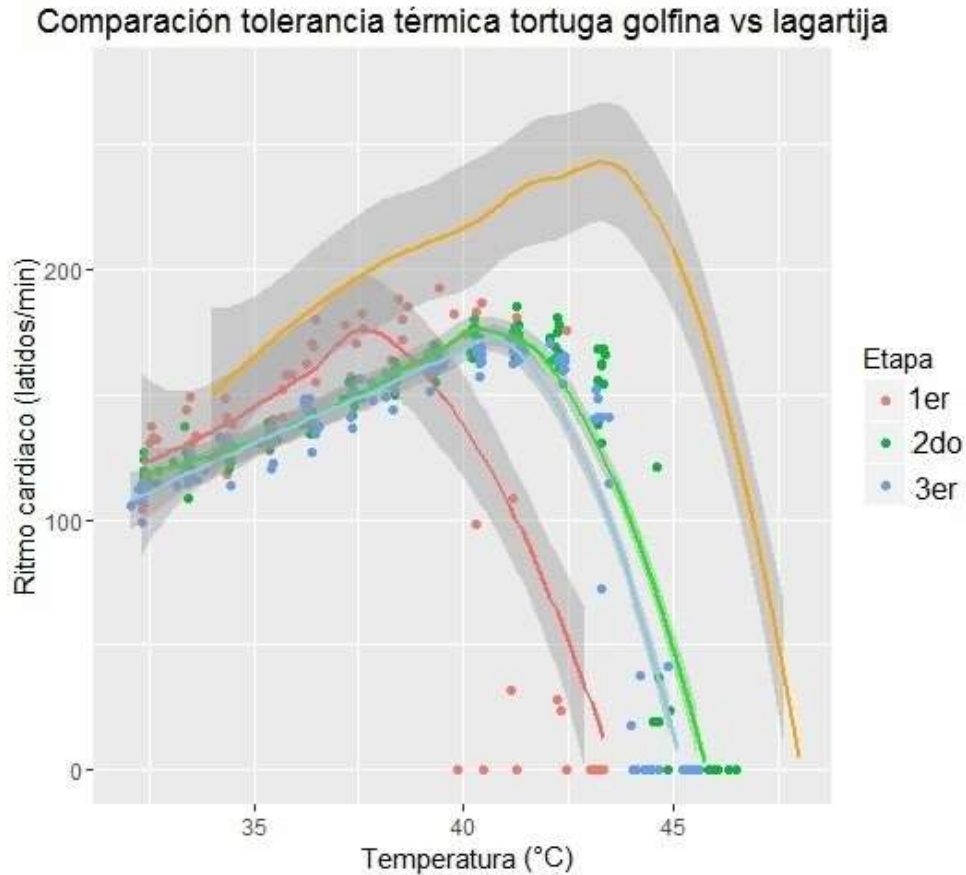


Figura 60. Patrón de ritmo cardíaco en embriones de lagartijas (línea amarilla) a lo largo del período de incubación de acuerdo con Angilletta *et al.*, (2013) comparado con patrón de ritmo cardíaco en diferentes tercios muestreados (1er, 2do, 3er) de embriones de tortuga marina provenientes de una incubación de 32°C. También se muestran las diferencias de coeficientes Q_{10} entre lagartijas y tortugas.

11. DISCUSIÓN

11.1. Valoración del ovoscopio para monitoreo del desarrollo embrionario en tortuga marina.

La ovoscopia o *candling* (en inglés) se refiere a una técnica no invasiva, de fácil manejo y de bajo costo que ha sido usada extensamente en granjas de cría de gallinas para monitorear la fertilidad de huevos, pero también para evaluar la calidad y el desarrollo de embriones desde etapas muy tempranas (Delany *et al.*, 1999). Su uso se ha extendido a

otras especies de aves e incluso para reptiles (Larivière *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Gwaza *et al.*, 2015) pero no existen registros de aplicaciones con tortugas marinas. En este trabajo se pudo validar su utilidad para determinar (1) la viabilidad de los embriones, en donde una coloración amarilla representaba un huevo inviable, mientras que un huevo con coloración anaranjada-rojiza y con vascularización simbolizaba un embrión viable; (2) examinar desde etapas tempranas hasta maduras. Entre los 7 o 9 días de incubación se pudo observar el embrión como un disco y en su interior la formación de un tubo que posteriormente constituirá los pliegues neurales (Yntema, 1968). En etapas maduras el embrión cubría la totalidad del espacio interno del huevo, pero esto no fue impedimento para registrar la movilidad del embrión con lo cual determinar su viabilidad; y (3) nos permitió de manera sencilla observar algunos rasgos morfológicos asociados a cambios de pigmentación en el cuerpo del embrión y que nos permitieron identificar las tres etapas clave (1er, 2do y 3er tercio) de nuestro estudio.

Sin embargo, la mayor contribución del uso del ovoscopio fue la posibilidad de determinar el efecto de tratamientos experimentales casi en tiempo real. Cuando se tienen organismos bajo algún método de incubación es difícil conocer el desarrollo embrionario en puntos intermedios del proceso. Generalmente el efecto de alguna condición o tratamiento debe esperar al final de la incubación y evaluar en términos del éxito de eclosión. En contraste, la ovoscopia ofrece un método efectivo y no invasivo que permite identificar la muerte del embrión prácticamente el día que ocurre. Otros métodos para evaluar al embrión que han sido empleados, por ejemplo, colocar al huevo en un baño de agua caliente por un minuto es un método que se ha usado con el fin de observar la movilidad del embrión, pero debido a su poca seguridad no puede usarse cuando se evalúan embriones en etapas tempranas (Lierz *et al.*, 2006), ya que pueden dañarse los embriones al ser manipulados de esa forma.

Aun así, el manejo de los huevos durante el proceso embrionario debe ser muy estricto, ya que cuando se toma el huevo de la incubadora para ser examinado bajo el ovoscopio no se debe rotar ni mucho menos agitar o realizar movimiento alguno que pueda afectar la integridad del embrión.

11.2. Efecto de nido de origen y temperatura de incubación sobre el crecimiento de embriones de tortuga golfina

Se ha estudiado el efecto de la temperatura de incubación y el de diferentes nidos sobre los rasgos morfométricos y capacidad locomotora de las crías de tortuga marina producidas (Reece *et al.*, 2002; Glen *et al.*, 2003; Booth, 2006; Read *et al.*, 2013; McGlashan *et al.*, 2015). Sin embargo, no se conoce si es que estos mismos factores tienen una influencia sobre el embrión durante su desarrollo. Debido a que el diseño experimental del presente trabajo contemplaba evaluar el grado en que diversos factores, incluyendo la temperatura de incubación y el nido de origen, afectan la capacidad de respuesta de los embriones a cambios abruptos de temperatura deseábamos contar con una primera verificación independiente de que efectivamente lo hacían. Para ello se realizó un seguimiento del crecimiento embrionario, con incubaciones de huevos de dos nidos provenientes de distintas madres a dos temperaturas (28° y 32°C), para identificar posibles diferencias entre tratamientos evidenciadas en las tasas de crecimiento.

Se encontró que si utilizamos la masa de los embriones para analizar el crecimiento embrionario a lo largo de la incubación, el patrón obtenido exhibe un comportamiento sigmoideal (Ver Figura 21) por el contrario de lo que se obtuvo al utilizar la longitud sobre el crecimiento de embriones exhibiendo un comportamiento logarítmico y sin un punto de inflexión (Ver Figura 22).

Es bien conocido que la temperatura influye sobre el tiempo de incubación, propiciando que temperaturas altas acorten los períodos de incubación (Booth, 2017), tal como se esperaba en nuestras incubaciones de 32°C, las cuales tardaron 45-47 días en promedio; comparadas con una incubación a 28°C, donde las crías completaron su desarrollo entre 65-67 días.

En ambas incubaciones tanto la de 32° como la de 28°C, se observó que la tasa de crecimiento (incremento de masa y de longitud) fue más alta para los embriones provenientes del nido 6 comparadas con las del nido 7. Esto dio como resultado crías del nido 6 más pesadas y de tamaño más grande que las crías obtenidas del nido 7 (Ver Figura 21 y Figura 22). Nuestros resultados coinciden con los registrados de Read *et al.* (2013) donde mencionan que la temperatura del nido no se correlaciona con la masa de las crías en tortuga caguama (*Caretta caretta*).

Podemos decir que es muy escasa la literatura donde evalúen tasas de crecimiento embrionario en reptiles a lo largo de una incubación, los trabajos que hay sólo toman en

cuenta crecimiento en términos de masa y de longitud, pero en crías ya eclosionadas como el trabajo de Packard *et al.* (1993) quienes muestran que la variación del tamaño del cuerpo y por tanto las reservas de nutrientes está dada por la variación del ambiente entre y dentro de nidos de tortuga mordedora (*Chelydra serpentina*).

A pesar de éstas diferencias en las tasas de crecimiento entre un nido y otro, las transiciones entre etapas de desarrollo ocurrieron sincrónicamente para ambos nidos en cada temperatura, pero se observó que la evolución entre etapas fue más lento en 28° que en 32°C. Reece *et al.* (2002) mencionan que en términos de masas las crías provenientes de temperaturas masculinizantes metabolizan con mayor rapidez sus reservas energéticas, lo que contrasta con nuestros resultados debido a que embriones de 28°C tardaron más tiempo en ganar masa mientras que los embriones incubados a 32° C adquirieron masas a una velocidad mayor.

Dichas diferencias en las tasas de crecimiento no intervinieron para que las crías de ambos nidos eclosionarán el mismo día dentro de cada temperatura. La ubicación vertical entre huevos dentro de un nido genera un gradiente de temperatura de arriba hacia abajo, es decir los huevos que están en la parte superior del nido poseen temperaturas relativamente más altas (de hasta 6°C) que los que están en la parte inferior (Thompson, 1988). No obstante, esta diferencia de temperatura por muy ligada que esté a las tasas de desarrollo embrionario, los huevos se sincronizan para eclosionar al mismo tiempo (Spencer *et al.*, 2001). Esto apunta a que los embriones de reptiles tienen gran capacidad de comunicación entre sí y logran ajustar su desarrollo y eclosionar en sincronía, aun perteneciendo a un mismo nido o a uno diferente (McGlashan *et al.*, 2012).

Se sabe que la temperatura de incubación influye directamente sobre procesos fisiológicos durante el desarrollo embrionario en reptiles (Booth, 2017), además de que es la responsable de la determinación sexual (Merchant-Larios *et al.*, 1997). Debido a que embriones de diferentes nidos, pero a la misma temperatura crecen a diferentes velocidades pero continúan sincrónicamente su desarrollo morfológico, sugiere que este último proceso involucra cambios estructurales independientemente del incremento en longitud o de masa corporal en los embriones hasta cambios metabólicos durante el desarrollo embrionario (Thompson, 1989).

Se sugiere que aumentos ligeros en la tasa metabólica, aumento de la frecuencia cardíaca, así como niveles altos de bióxido de carbono constituyen señales que propician una aceleración en el desarrollo y crecimiento embrionario durante las últimas fases (Spencer & Janzen, 2011).

Estos resultados preliminares nos permitieron inferir que, debido a sus efectos significativos sobre el crecimiento, se esperaría que tanto la temperatura de incubación como el nido de origen tendrán una importante influencia sobre procesos metabólicos del embrión bajo desarrollo por lo que se incluyeron como parámetros experimentales en nuestro estudio.

11.3. Efecto de ciclo circadiano sobre el ritmo cardíaco de embriones de tortuga golfina.

Se ha registrado que por medio de la frecuencia cardíaca de tortugas es posible identificar y dar seguimiento a ritmos circadianos metabólicos y su asociación con factores endógenos (McGlashan *et al.*, 2015). También se sabe que procesos de termorregulación, conductuales y la actividad locomotora en reptiles están asociados a ritmos circadianos (Ellis *et al.*, 2008). Ciclos circadianos han sido descritos en diversos organismos tales como los peces los cuales dependen de la plasticidad del organismo para modular sus hábitos o ritmos de actividad que se asocian a factores como intensidad de la luz, temperatura, depredación, disponibilidad de alimento o competencia intraespecífica (Reebs, 2002). Dichos ritmos son generados por un reloj biológico que se sincroniza en un lapso de 24 horas principalmente mediante reacciones del organismo a las fluctuaciones de luz y oscuridad.

En reptiles se han registrado ritmos diarios de termorregulación conductual en una tortuga de agua dulce, *Chrysemys scripta elegans*, (Jarlin *et al.*, 1989) y ritmos en la actividad locomotora en lagartija (*Tiliqua rugosa*) (Ellis *et al.*, 2007), que se pueden interpretar como ciclos circadianos regulados por factores endógenos que se sincronizan con patrones diurnos de luz-obscuridad.

A pesar de que en organismos que pasan su desarrollo bajo un período carente de señales ambientales o sin cuidado parental los ciclos circadianos pueden resultar inestables y carecer de organización temporal (Laposky *et al.*, 2008), estudios con fases embrionarias muestran que incluso se pueden presentar en estas señales, como por ejemplo el consumo de oxígeno en embriones de serpientes (Dmi'el, 1969) y frecuencias cardíacas en embriones de tortugas (Loudon *et al.*, 2013).

Un estudio de embriones de tortuga de río, *Emydura macquarii*, (Loudon *et al.*, 2013) encontró un ciclo circadiano para el ritmo cardíaco que se inició a la mitad del período de gestación, que no estaba asociado al horario diario, y que se mantuvo hasta la eclosión.

Este ciclo tenía una periodicidad de aproximadamente 6hrs y ocasionaba fluctuaciones de un $\pm 10\%$ de la tasa cardíaca promedio. Este resultado sugiere que ritmos circadianos endógenos para procesos metabólicos en embriones de tortugas se establecen en un período de desarrollo más temprano que en otros taxones de vertebrados.

Si existieran ciclos circadianos para el ritmo cardíaco en tortuga marina podría impactar el desarrollo de nuestro experimento debido a que tendríamos que asegurar que los diferentes muestreos se realizarn en la misma fase de este ritmo. Sin embargo, nuestros resultados indican que en embriones de tortuga golfinia no se manifiesta un ciclo circadiano para su ritmo cardíaco. Más bien, resultó evidente que la temperatura de la arena y pequeñas fluctuaciones en este parámetro externo era la que ejerció el impacto con mayor influencia. No obstante, para evitar afectaciones, todos los experimentos de evaluaciones del ritmo cardíaco se realizaron iniciando y terminando a la misma hora del día además de que los incrementos en el ritmo cardíaco bajo estrés térmico rebasan por mucho las fluctuaciones esperadas con base en los estudios de ciclos circadianos.

11.4. Respuestas metabólicas en embriones a estrés térmico

11.4.1. Contribuciones metodológicas

Para entender los impactos producidos por el calentamiento global existen trabajos recientes en organismos marinos que nos permiten conocer sus límites térmicos superiores como parámetro crítico para cuantificar y evaluar la tolerancia térmica ante el aumento de temperatura ambiental.

Se ha utilizado un índice fisiológico muy común llamado Máximo Térmico Crítico (CTMax, por sus siglas en inglés) que nos permite deducir cómo los organismos responden cuando se someten a una aplicación de incremento gradual de temperatura con la finalidad de encontrar un punto crítico, ya sea que pierdan el equilibrio o que no se registren contracciones musculares (Vinagre *et al.*, 2015).

Las curvas de rendimiento térmico son empleadas para conocer este punto crítico y la forma típica en la que se representa es mediante una curva tipo gaussiana limitada por valores de temperaturas mínimas (CTmin) y máximas críticas (CTmax) y dependiendo de la variación de las temperaturas en las diferentes latitudes geográficas, el rendimiento térmico evolucionará (Johansson & Laurila, 2017) permitiendo estimar la tolerancia que tienen los diferentes organismos al calentamiento (Deutsch *et al.*, 2008). Este método se ha utilizado en diferentes organismos tanto acuáticos como terrestres, algunos ejemplos

son camarones, cangrejos y peces (Vinagre *et al.*, 2015), así como en anfibios (Maness & Hutchison, 1980) y tortugas (Webb & Witten, 1973).

Como bien ya se ha mencionado a lo largo del presente trabajo con el uso del ovoscopio logramos observar cambios de pigmentación en el cuerpo de los embriones con la finalidad de escoger previamente embriones viables y que fueran las diferentes fases embrionarias deseadas para aplicarles el tratamiento térmico.

Se obtuvo ventaja sobre los métodos tradicionales ya que éstos aplican el tratamiento a una temperatura constante y se espera hasta el final de la incubación para poder determinar la mortalidad de embriones, así como tampoco es posible detener el experimento durante la parte inicial o intermedia del desarrollo embrionario para observar mortalidad, al contrario con el monitor *Buddy* el cual nos permitió monitorear los embriones en diferentes fases del desarrollo y evaluar la viabilidad del embrión midiendo su ritmo cardíaco para que fuera conveniente para las pruebas. Además con el monitor se ratificó la mortalidad del embrión en diferentes fases del desarrollo justo en el momento en el que sufre un paro cardíaco.

Existen numerosos trabajos que utilizan el ritmo cardíaco como un indicador cardiovascular viable en diferentes especies, pero en muchos de ellos recurren a procesos directos para medir la presión arterial, disecciones a través de microscopios y hasta mediciones en donde se debe impedir o pausar el desarrollo embrionario (Birchard & Reiber, 1996). El monitor *Buddy* trabaja mediante una emisión de luz infrarroja (IR) hacia el huevo detectando movimiento y amplifica la señal para observar el patrón de ritmo cardíaco medido en latidos por minuto (BPM por sus siglas en inglés), no obstante esta emisión de luz IR es una fuente importante de calor por lo que un monitor podría alterar los resultados del ritmo cardíaco (Sartori *et al.*, 2015).

El monitor fue una buena herramienta en nuestras pruebas de tolerancia térmica, siendo la primera vez que se usa en tortugas marinas para definir los límites térmicos superiores en estos organismos. Sartori *et al.* (2015) han registrado buenos resultados sobre las mediciones de ritmo cardíaco en huevos de tortuga y de iguana, sin embargo está sujeto a una buena aplicación ya que es posible que exista alguna alteración que interfiera sobre el estado térmico del embrión debido a la exposición de luz IR bajo periodos de tiempo prolongados (horas) pero este problema es mejor observado cuando se manejan huevos de tamaño pequeño. Por ello, nuestras evaluaciones de ritmo cardíaco en embriones de tortuga golfina no duraron más allá de 2 minutos dentro del monitor.

11.4.2. Factores con efectos significativos

Existen diferentes factores que pueden influir sobre los límites de tolerancia térmica en los embriones, como se mostró la etapa de desarrollo fue el factor con mayor significancia ante la respuesta del ritmo cardíaco ya que en todas las pruebas experimentales, los embriones resultantes del primer tercio exhibieron una respuesta más aguda frente al calentamiento, esto se debe al grado de desarrollo del corazón que estos embriones presentan en dicha fase, ya que apenas comienza la formación de un corazón incipiente con apenas dos cavidades constituidas y por tanto el organismo tiene poca capacidad de mantenimiento de homeostasis y requiere un mayor esfuerzo (función cardíaca) para contrarrestar el estrés térmico, lo que le confiere una mayor sensibilidad ante el calentamiento.

Se ha demostrado en diferentes especies de reptiles que éstos poseen un ritmo cardíaco relativamente estable, como lagartijas, serpientes e iguanas (Sartori *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha validado en tortugas que el último tercio de la incubación es una etapa crítica donde existe un vínculo entre la masa corporal del embrión y su metabolismo, ya que conforme la masa del embrión aumenta a lo largo de la incubación, el metabolismo también aumentará debido a un aumento continuo de los costos de crecimiento y mantenimiento (Birchard & Reiber, 1995).

Sin embargo, estudios recientes indican que el patrón de cambio de la frecuencia cardíaca puede diferir entre los reptiles durante su desarrollo, por ejemplo, en embriones del lagarto americano se ha corroborado que su frecuencia cardíaca es estable en el último 40% de incubación (Crossley & Burggren, 2009). Dicha estabilidad en su metabolismo puede ser comparada con lo obtenido en nuestros embriones de tortuga marina y además el desarrollo avanzado del corazón de nuestros embriones en etapas provenientes del tercer tercio, favoreció a los organismos para requerir de menor esfuerzo para enfrentar el estrés térmico. Crossley II *et al.* (2017) confirman que la frecuencia cardíaca en embriones de tortuga golfina se mantiene estable al 70% y 90% de desarrollo durante la incubación mientras que la presión arterial se duplica.

Por otro lado, se ha registrado que existen fluctuaciones diarias de temperatura durante la incubación de embriones de tortuga marina lo que induce a una mayor tolerancia frente a temperaturas altas debido al impacto agregado del calor metabólico en la etapa final del desarrollo (van Lohuizen *et al.*, 2016) y por tanto la temperatura interna del huevo también irá en aumento conforme crece el embrión (Ono *et al.*, 1994).

De acuerdo con nuestros resultados validamos la hipótesis donde etapas maduras poseen una frecuencia menor comparada con etapas del primer tercio. Datos anecdóticos en campo registran una mayor mortalidad de embriones en etapas correspondientes al primer tercio a temperaturas altas (alrededor de 34°C), debido a que es una etapa donde ocurre la neurulación y organogénesis. Sin embargo, no se tenía una evidencia experimental para corroborar que efectivamente el metabolismo en embriones de dicha fase se ve alterado en mayor grado por la temperatura con respecto a etapas maduras, lo que nuestro protocolo asegura claramente a lo largo del desarrollo embrionario de tortuga golfina.

Otro factor importante que ejerce una fuerte influencia en la tolerancia de los embriones frente al calentamiento agudo fue el efecto de la temperatura, la cual evidentemente le confiere una pre-adaptación directa, es decir a mayor temperatura de incubación, los valores para parámetros críticos (TRCmax y TPC) también aumentan. Lo que concuerda con Bowler (2005), quien afirma que cuando se aclimata un organismo a temperaturas cálidas, éste tendrá mayor tolerancia a la exposición de calor.

Por su parte, Birchard & Reiber (1996) observan en incubaciones de tortuga mordedora, que embriones provenientes de temperaturas de incubación más altas muestran un ritmo cardíaco más alto comparados con embriones incubados a menor temperatura, lo que puede interpretarse como una aclimatación durante el período de crecimiento exponencial de los embriones.

El efecto de nido en las pruebas de tolerancia térmica fue evaluado debido a que como ya vimos, a partir del experimento de tasas de desarrollo embrionario esperaríamos que los embriones del nido con huevos de mayor peso tendrían un desarrollo y metabolismo mayor y por lo tanto una mayor capacidad para responder al estrés térmico, sin embargo no se encontraron efectos significativos entre los diferentes nidos, por lo que este parámetro tiene menor efecto que el resto de los parámetros significativos tales que la etapa de desarrollo y la temperatura de incubación.

A pesar de no ser significativo el efecto de nido ante la respuesta metabólica de los embriones, se encontró un patrón que es consistente siendo que el nido BB con pesos mayores exhibe valores menores de ritmo cardíaco por lo que podría decirse que embriones más pequeños o con menor peso tienen una mayor vulnerabilidad ante el calentamiento. De ser así, existe una sugerencia sobre la relación peso huevo sobre el efecto de la capacidad metabólica, aunque no es significativa de acuerdo con las pruebas estadísticas. Quizá estemos al límite de resolución del método con el uso del monitor *Buddy* y si

tuviéramos un método con mayor robustez y sensibilidad para estimar el ritmo cardiaco serían visibles las diferencias entre nidos.

11.4.3. Nueva perspectiva de límites de tolerancia térmica

Los límites térmicos se ven afectados por la intensidad y la duración del estrés que se aplique, sin embargo, el desarrollo y la aplicación de modelos de tolerancia dependen de estimaciones experimentales durante cambios que reflejan las condiciones naturales. Hoy en día las fluctuaciones de temperatura en los organismos son cada vez más rápidas y amplias debido al cambio climático (Angilletta *et al.*, 2013). Además, los estudios en condiciones crónicas sesgan las predicciones de los efectos del estrés en los organismos, por lo que es más recomendable realizar estudios en condiciones agudas para conocer a detalle los cambios producidos en el desempeño de los embriones, sin embargo estos estudios son escasos. Hay estudios en nidos naturales y otros donde se manipulan las temperaturas, pero las fluctuaciones térmicas tienen poco impacto sobre el desempeño embrionario y no revelan datos efectivos ya que no exceden el rango actual de temperaturas.

Asimismo, Rezende *et al.* (2014) sugieren que se puede generar una compensación entre una tolerancia aguda y una crónica a temperaturas altas, y esto explicaría que las poblaciones originarias de ambientes cálidos presentan límites térmicos máximos más bajos comparados con los de poblaciones provenientes de ambientes fríos. Además, intervienen diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos como limitación de oxígeno, función neural, metabolismo, inmunidad, desnaturalización enzimática, entre otros (Johansson & Laurila, 2017).

Se sospechaba poco que los embriones de tortuga golfina soportarían temperaturas elevadas como las que registramos en las pruebas, alrededor de los 44-46°C cuando ocurre el paro cardíaco y parece extrema la tolerancia respecto a lo esperado según los rangos típicos en nidos de tortuga marina, pero se han registrado que a veces se llegan a observar eventos de temperaturas altas de incubación en campo de más de 35°C, lo que provoca una tasa alta de mortalidad de embriones en una arribada de tortuga golfina en casi todos los nidos, limitando o interfiriendo el desarrollo embrionario más allá de su tolerancia térmica (Valverde *et al.*, 2010). Esto nos confirma que los embriones son vulnerables a las fluctuaciones climáticas a corto plazo.

Al comparar la curva de respuesta del ritmo cardíaco en embriones de tortuga golfina y en lagartijas observamos que si bien nuestros embriones reflejan una tolerancia mayor a la

esperada (24-34°C) su intervalo de tolerancia es mucho menor que el de la lagartija, esta comparación fue posible debido a que usamos la misma metodología que Angilletta *et al.* (2013).

Nuestro estudio en condiciones agudas nos permitió conocer los puntos críticos, TRCmax y TPC para en un futuro poder modelar los impactos biológicos que podrían enfrentar los embriones de tortuga marina ante el calentamiento global y además inferir si el incremento de las temperaturas en nidos naturales permanecerán dentro de límites tolerables para los embriones en sus diferentes fases de desarrollo y además conocer si dichas temperaturas podrían causar un sesgo en las proporciones de sexo de las crías dentro de los nidos (Booth, 2017). También eventos cortos con presencia de lluvias donde baja la temperatura ambiental puede propiciar que se enfríe la arena y bajen las temperaturas dentro de los nidos propiciando un sesgo masculino en las crías y bajas tasas de mortalidad (Laloë *et al.*, 2016).

Los límites térmicos que se esclarecen en este estudio podrían formar parte de una estrategia para mitigar el aumento de temperaturas que acecha el calentamiento global y aplicarlas a las áreas de anidación que actualmente experimentan temperaturas cercanas al umbral térmico superior (Fuentes *et al.*, 2012).

11.4.4. Relevancia de los resultados para la conservación

Los modelos sobre cambio climático predicen que las olas de calor seguirán en aumento e intensidad, frecuencia y duración (Vinagre *et al.*, 2015) por lo que se tiene la necesidad de entender el comportamiento de los organismos y las estrategias que adoptan para enfrentar fluctuaciones en la temperatura ambiental (Johansson & Laurila, 2017). Los organismos ectotermos como los anfibios y los reptiles son más sensibles al calentamiento global (Scudiero *et al.*, 2014) y resultan afectados por dichas fluctuaciones provocando alteraciones en sus funciones fisiológicas por lo que deben valerse de diferentes estrategias para reducir su tasa metabólica; por ejemplo en tortugas se han registrado períodos largos de apnea, disminución de la frecuencia cardíaca y cambios en el flujo sanguíneo (Crossley *et al.*, 2015). También se sabe que los organismos ectotermos que habitan en zonas tropicales son más propensos a resentir las variaciones ambientales (Johansson & Laurila, 2017).

Las amenazas del cambio climático sobre las poblaciones silvestres han llevado a numerosas investigaciones científicas para esclarecer los límites térmicos máximos en ectotermos, dando continuidad a estudios sobre la vulnerabilidad de las especies frente al

cambio climático (Deutsch *et al.*, 2008). Así, este trabajo permitió contribuir con un mejor conocimiento sobre límites reales bajo condiciones de cambios agudos de temperatura en embriones de tortuga marina.

Esta investigación contribuye con nuevo conocimiento en el tema de tolerancia térmica determinando los límites en diferentes fases embrionarias de la tortuga golfina que hasta la fecha no se conocían con precisión, sobre bajo condiciones de cambios agudos en temperaturas. Además, el protocolo validó el uso de un ovoscopio de construcción económica que permite observar la condición de los embriones dentro del huevo en tiempo real. Sabiendo cuáles son las temperaturas letales para cada fase de desarrollo podemos identificar la vulnerabilidad y las dimensiones de los impactos de la temperatura ambiental que tendrán sobre los nidos naturales de las poblaciones de tortugas marinas. El método tradicional, empleado generalmente hasta ahora, evalúa mortalidad solamente en función del éxito de eclosión para lo cual se requiere esperar el término total del período del desarrollo embrionario de entre 45 y más de 60 días, además de que difícilmente se logra identificar cuál es la etapa más vulnerable. Adicionalmente, el enfoque tradicional sesga las predicciones y no toma en cuenta que los organismos son capaces de sobrevivir durante exposiciones periódicas a temperaturas letales bajo exposiciones crónicas (Siddiqui *et al.*, 1973).

Sobre del exitoso protocolo se recomienda extender este estudio para documentar respuestas a estrés en condiciones agudas para inferir impactos realistas de importancia biológica (Huey *et al.*, 2009) a diferentes poblaciones de la misma especie. Esto abriría un nuevo panorama para futuras investigaciones en donde también se tendrá que considerar una gama de temperaturas subletales y diferentes tiempos de exposición para conocer porcentajes de mortalidad.

El conocimiento sobre los límites térmicos superiores permitirá mejorar las prácticas de incubación en los campamentos tortugueros para monitorear la frecuencia y duración de temperaturas extremosas en los nidos y optimizar su cuidado. No obstante los resultados robustos del presente trabajo, será indispensable corroborar con los resultados en nidos naturales en donde las fluctuaciones de temperaturas son variables.

12. CONCLUSIONES

Nuevos dispositivos

- El sistema de incubadoras controladas por el microprocesador *Arduino* fue capaz de mantener temperaturas constantes de incubación, permitiendo observar diferencias entre tasas de crecimiento a dos temperaturas de incubación y de diferentes nidos a lo largo del período de incubación.
- El uso del ovoscopio nos permitió validar la viabilidad de los embriones, así como observar rasgos morfológicos asociados a cambios de pigmentación en embriones durante las diferentes fases embrionarias de interés.
- El ovoscopio ofreció un método efectivo y no invasivo para hacer observaciones de los embriones en tiempo real cuando finalizaban las pruebas de estrés térmico.
- El monitor *Buddy* instrumento no invasivo, permitió analizar el ritmo cardíaco de los embriones en diferente fase de su desarrollo embrionario e identificar paro cardíaco inmediatamente durante las pruebas de estrés térmico lo que agiliza investigaciones sobre la respuesta fisiológica a condiciones estresantes en embriones de tortugas marinas.

Dinámica de crecimiento de embriones

- El incremento de masa y longitud de embriones, tanto en una incubación de 32°C como de 28°C, se observó un importante efecto de nido de origen al encontrar consistentemente una tasa de crecimiento más alta para embriones provenientes del nido 6.
- En ambas temperaturas de incubación, a pesar de las diferencias marcadas en longitud y masa entre nidos, la eclosión se realizó sincrónicamente para ambos nidos en cada temperatura.
- La medición de tasas de crecimiento a diferentes temperaturas de incubación resultó novedoso aportando información valiosa para el manejo y conservación de nidos en campamentos tortugeros.

Ciclo circadiano

- No se detectó un ciclo circadiano para el ritmo cardíaco en embriones de tortuga golfina que pudiera afectar el desarrollo de nuestras evaluaciones, no obstante pequeñas

fluctuaciones en la temperatura ambiental puede tener un papel significativo en la variación del ritmo cardíaco.

Límites de tolerancia térmica en embriones de tortuga golfina

- De los factores intrínsecos evaluados, solamente la etapa de desarrollo influyó significativamente sobre el ritmo cardíaco en respuesta a incrementos agudos en la temperatura; ya que embriones en primer tercio del desarrollo exhibieron una respuesta más aguda comparada con embriones de etapas avanzadas.
- La mayor temperatura de incubación (32° vs 28°C) provocó un aumento proporcional en los valores críticos (TRCmax y TPC) confiriéndoles una aclimatación previa a los embriones incubados respecto a lo que se incubaron a la menor temperatura.
- Los valores máximos de ritmo cardíaco del 1er tercio tuvieron un promedio de 170 LPM y aquellos en los últimos dos tercios oscilan entre 170-180 LPM para una incubación de 32°C. En contraste, las etapas avanzadas incubados a 28°C exhibieron valores promedio entre 160-170 LPM.
- Las TRCmax observadas para embriones del primer tercio fueron de 37.5°C y hasta 41°C aproximadamente para embriones del segundo y tercer tercio de desarrollo.
- Las TPC (44-46°C) que se registran en este estudio son valores mayores que los registrados como límites mortales en playa o en laboratorio bajo condiciones crónicas de temperaturas elevadas (34-35°C).
- No encontramos influencia significativa por el nido de origen en la tolerancia al estrés térmico. Sin embargo, las incipientes diferencias entre nidos justifican indagar de nuevo con tamaños de muestra mayores para confirmarlo.
- El análisis de la respuesta completa, incluyendo la fase lineal y la subsecuente con máximos valores de ritmo cardíaco y el paro cardíaco final permitió una mejor y más robusta comprensión de las influencias de los parámetros estudiados.
- El protocolo desarrollado en este proyecto y su complementación con el ovoscopio, ofrecen una alternativa atractiva con tiempos de experimentación mucho más accesibles y con mayor precisión que el método tradicional que requiere esperar todo el período de incubación para evaluar niveles de eclosión.
- Este es el primer estudio que determina los límites térmicos superiores para embriones de tortuga golfina en condiciones de cambios agudos de temperatura.

- Los valores encontrados de tolerancia térmica en embriones fueron sorprendentemente altos para las condiciones naturales en donde se encuentran los huevos de tortugas marinas que no se conoce rebasen temperaturas de 40°C.
- Con base en estos resultados, se recomienda realizar pruebas adicionales para conocer la mortalidad para diversas combinaciones de tiempos de exposición y una gama de temperaturas.

13. LITERATURA CITADA

- Abreu-Grobois, F.A. (1999). Genética poblacional y filogeografía de las tortugas marinas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) y laúd (*Dermochelys coriacea*) en el Pacífico mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. G007. México D. F.
- Ackerman, R.A. (1997). The nest environment and the embryonic development of sea turtles. *The biology of sea turtles*, 1, 83-106.
- Akiyama, R., Matsuhisa, A., Pearson, J.T., & Tazawa, H. (1999). Long-term measurement of heart rate in chicken eggs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124(4), 483-490.
- Angilletta Jr, M.J., Zelic, M.H., Adrian, G.J., Hurliman, A M., & Smith, C.D. (2013). Heat tolerance during embryonic development has not diverged among populations of a widespread species (*Sceloporus undulatus*). *Conservation physiology*, 1(1), cot018.
- Bertens, L.M., Richardson, M.K., & Verbeek, F.J. (2010). Analysis of Cardiac Development in the Turtle *Emys orbicularis* (Testudines: Emidydae) using 3-D Computer Modeling from Histological Sections. *The Anatomical Record*, 293(7), 1101-1114.
- Birchard, G.F., & Reiber, C.L. (1995). Growth, metabolism, and chorioallantoic vascular density of developing snapping turtles (*Chelydra serpentina*): influence of temperature. *Physiological Zoology*, 68(5), 799-811.
- Birchard, G.F., & Reiber, C.L. (1996). Heart rate during development in the turtle embryo: effect of temperature. *Journal of Comparative Physiology B*, 166(8), 461-466.
- Booth, D.T. (2006). Influence of incubation temperature on hatchling phenotype in reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(2), 274-281.
- Booth, D.T. (2017). The influence of incubation temperature on sea turtle hatchling quality. *Integrative zoology*.

- Booth, D.T., & Evans, A. (2011). Warm water and cool nests are best. How global warming might influence hatchling green turtle swimming performance. *Plos One*, 6(8), e23162.
- Booth, D.T., Feeney, R., & Shibata, Y. (2013). Nest and maternal origin can influence morphology and locomotor performance of hatchling green turtles (*Chelonia mydas*) incubated in field nests. *Marine Biology*, 160(1), 127-137.
- Bowler, K. (2005). Acclimation, heat shock and hardening. *Journal of Thermal Biology*, 30(2), 125-130.
- Briseño-Dueñas, R. (1980) Tesis Profesional Aspectos biológicos y protección de la tortuga golfinia *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz) en el Verde, Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, 54 pp.
- Bustard, H.R. (1971). Temperature and water tolerances of incubating sea turtle eggs. *Br. J. Herpetol*, 4, 196-198.
- Bustard, H.R., & Greenham, P. (1968). Physical and chemical factors affecting hatching in the green sea turtle, *Chelonia mydas* (L.). *Ecology*, 49(2), 269-276.
- Crastz, F. (1982). Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Revista de Biología Tropical*, 30(2), 113-120.
- Crossley II, D.A., Crossley, J.L., Smith, C., Harfush, M., Sánchez-Sánchez, H., Garduño-Paz, M.V., & Méndez-Sánchez, J.F. (2017). Developmental cardiovascular physiology of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 211, 69-76.
- Crossley, D.A., & Burggren, W.W. (2009). Development of cardiac form and function in ectothermic sauropsids. *Journal of morphology*, 270(11), 1400-1412.
- Crossley, D.A., Wearing, O.H., Platzack, B., Hartzler, L.K., & Hicks, J.W. (2015). Acute and chronic temperature effects on cardiovascular regulation in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). *Journal of Comparative Physiology B*, 185(4), 401-411.
- D.O.F. (1986). Decreto por el que se determinan como zonas de reserva y sitios de refugio para la protección, conservación, repoblación, desarrollo y control, de las diversas especies de tortugas marinas, los lugares donde anidan y desovan dichas especies. p 16-17. Secretaría de Desarrollo Social. 29 de octubre de 1986. *Gaceta Ecológica. INE-SEMARNAP, México*.
- Delany, M.E., Tell, L.A., Millam, J.R., & Preisler, D.M. (1999). Photographic candling analysis of the embryonic development of orange-winged Amazon parrots (*Amazona amazonica*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 116-123.

- Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C. & Martin, P.R. (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6668-6672.
- Dmi'el, R. (1969). Circadian rhythm of oxygen consumption in snake embryos. *Life sciences*, 8(24), 1333-1341.
- Drake, D.L., & Spotila, J.R. (2002). Thermal tolerances and the timing of sea turtle hatchling emergence. *Journal of Thermal Biology*, 27(1), 71-81.
- Du, W.G., & Ji, X. (2003). The effects of incubation thermal environments on size, locomotor performance and early growth of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Journal of Thermal Biology*, 28(4), 279-286.
- Du, W.G., & Shine, R. (2008). The influence of hydric environments during egg incubation on embryonic heart rates and offspring phenotypes in a scincid lizard (*Lampropholis guichenoti*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(1), 102-107.
- Du, W.G., Zhao, B., & Shine, R. (2010). Embryos in the fast lane: high-temperature heart rates of turtles decline after hatching. *PLoS One*, 5(3), e9557.
- Du, W.G., Zhao, B., Chen, Y., & Shine, R. (2011). Behavioral thermoregulation by turtle embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9513-9515.
- Ellis, D.J., Firth, B.T., & Belan, I. (2007). Circadian rhythms of locomotor activity and temperature selection in sleepy lizards, *Tiliqua rugosa*. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(7), 695-701.
- Ellis, D.J., Firth, B.T., & Belan, I. (2008). Interseasonal variation in the circadian rhythms of locomotor activity and temperature selection in sleepy lizards, *Tiliqua rugosa*. *Journal of Comparative Physiology A*, 194(8), 701.
- Frazier, J. (1983). Análisis estadístico de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz) de Oaxaca, México. *Ciencia Pesquera*, 4, 49-75.
- Fuentes, M.M.P.B., & Abbs, D. (2010). Effects of projected changes in tropical cyclone frequency on sea turtles. *Marine Ecology Progress Series*, 412, 283-292.
- Fuentes, M.M.P.B., Dawson, J.L., Smithers, S.G., Hamann, M., & Limpus, C.J. (2010a). Sedimentological characteristics of key sea turtle rookeries: potential implications under projected climate change. *Marine and Freshwater Research*, 61(4), 464-473.
- Fuentes, M.M.P.B., Fish, M.R., & Maynard, J.A. (2012). Management strategies to mitigate the impacts of climate change on sea turtle's terrestrial reproductive phase. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 17(1), 51-63.

- Fuentes, M.M.P.B., Limpus, C.J., & Hamann, M. (2011). Vulnerability of sea turtle nesting grounds to climate change. *Global Change Biology*, 17(1), 140-153.
- Fuentes, M.M.P.B., Limpus, C.J., Hamann, M., & Dawson, J. (2010b). Potential impacts of projected sea-level rise on sea turtle rookeries. *Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems*, 20(2), 132-139.
- Glen, F., Broderick, A.C., Godley, B.J., & Hays, G.C. (2003). Incubation environment affects phenotype of naturally incubated green turtle hatchlings. *Marine Biological Association of the United Kingdom. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83(5), 1183.
- Greenbaum, E. (2002). A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology*, 80(8), 1350-1370.
- Gwaza, D.S., Dim, N.I., & Momoh, O.M. (2015). Investigation of Possible Genetic Background of Embryonic Mortality in two Populations of Nigeria Local Chicken Ecotypes. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences (ISSN: 2321-1571)*, 3(05).
- Hamann, M., Fuentes, M.M., Ban, N.C., & Mocellin, V.J. (2013). 13 Climate Change and Marine Turtles. *The biology of sea turtles*, 3, 353.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D.W., & Medina-Elizade, M. (2006). Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14288-14293.
- Hawkes, L.A., Broderick, A.C., Godfrey, M.H., & Godley, B.J. (2009). Climate change and marine turtles. *Endangered Species Research*, 7(2), 137-154.
- Hawkes, L.A., Broderick, A.C., Godfrey, M.H., & Godley, B.J. (2007). Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology*, 13(5), 923-932.
- Hendrickson, J.R. (1958). The green sea turtle, *Chelonia mydas* (Linn.) in Malaya and Sarawak. *Journal of Zoology*, 130(4), 455-535.
- Hicks, J.W. (2002). The physiological and evolutionary significance of cardiovascular shunting patterns in reptiles. *Physiology*, 17(6), 241-245.
- Howard, R., Bell, I., & Pike, D.A. (2014). Thermal tolerances of sea turtle embryos: current understanding and future directions. *Endangered Species Research*, 26(1), 75-86.
- Huey, R.B., Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Vitt, L.J., Hertz, P.E., Pérez, H.J.Á., & Garland, T. (2009). Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1664), 1939-1948.

- IPCC. (2007). Climate change: The physical science basis. Contribution of working group 1 to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press.
- Ischer, T., Ireland, K., & Booth, D.T. (2009). Locomotion performance of green turtle hatchlings from the Heron Island Rookery, Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 156(7), 1399-1409.
- Jarling, C., Scarperi, M., & Bleichert, A. (1989). Circadian rhythm in the temperature preference of the turtle, *Chrysemys (= Pseudemys) scripta elegans*, in a thermal gradient. *Journal of Thermal Biology*, 14(4), 173-178.
- Johansson, M.P., & Laurila, A. (2017). Maximum thermal tolerance trades off with chronic tolerance of high temperature in contrasting thermal populations of *Radix balthica*. *Ecology and evolution*, 7(9), 3149-3156.
- Jourdan, J., & Fuentes, M.M.P.B. (2015). Effectiveness of strategies at reducing sand temperature to mitigate potential impacts from changes in environmental temperature on sea turtle reproductive output. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 20(1), 121-133.
- Kik, M.J., & Mitchell, M.A. (2005). Reptile cardiology: a review of anatomy and physiology, diagnostic approaches, and clinical disease. In *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* (Vol. 14, No. 1, pp. 52-60). WB Saunders.
- Koshiba-Takeuchi, K., Mori, A.D., Kaynak, B.L., Cebra-Thomas, J., Sukonnik, T., Georges, R.O., Latham, S., Beck, L., Henkelman, R.M., Black, B.L., Olson, E.N., Wade, J., Takeuchi, J.K., Nemer, M., Gilbert, S.F., & Bruneau, B.G. (2009). Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature*, 461(7260), 95.
- Laloë, J.O., Esteban, N., Berkel, J., & Hays, G.C. (2016). Sand temperatures for nesting sea turtles in the Caribbean: Implications for hatchling sex ratios in the face of climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474, 92-99.
- Laposky, A.D., Bass, J., Kohsaka, A., & Turek, F.W. (2008). Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS letters*, 582(1), 142-151.
- Larivière, J.M., Michaux, C., & Leroy, P. (2009). Genetic parameters of embryonic viability traits in a traditional chicken breed. *International Journal of Poultry Science*, 8(12), 1183-1188.

- Li, T., Zhao, B., Zhou, Y. K., Hu, R., & Du, W. G. (2014). Thermoregulatory behavior is widespread in the embryos of reptiles and birds. *The American Naturalist*, 183(3), 445-451.
- Lierz, M., Gooss, O., & Hafez, H. M. (2006). Noninvasive heart rate measurement using a digital egg monitor in chicken and turkey embryos. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 20(3), 141-146.
- Loudon, F.K., Spencer, R.J., Strassmeyer, A., & Harland, K. (2013). Metabolic circadian rhythms in embryonic turtles. *Integrative and comparative biology*, 53(1), 175-182.
- Maness, J.D., & Hutchison, V.H. (1980). Acute adjustment of thermal tolerance in vertebrate ectotherms following exposure to critical thermal maxima. *Journal of Thermal Biology*, 5(4), 225-233.
- Männer, J. (2000). Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *The Anatomical Record*, 259(3), 248-262.
- Männer, J. (2009). The anatomy of cardiac looping: a step towards the understanding of the morphogenesis of several forms of congenital cardiac malformations. *Clinical anatomy*, 22(1), 21-35.
- Márquez, M.R. (1990). Sea Turtles of the World. An annotated and illustrated catalog of sea turtle species known to date. *FAO Fish. Synopsis*, (125), 11.
- Maulany, R.I., Booth, D.T., & Baxter, G.S. (2012a). The effect of incubation temperature on hatchling quality in the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia: implications for hatchery management. *Marine biology*, 159(12), 2651-2661.
- Maulany, R.I., Booth, D.T., & Baxter, G.S. (2012b). Emergence success and sex ratio of natural and relocated nests of Olive Ridley turtles from Alas Purwo National park, East Java, Indonesia. *Copeia*, 2012(4), 738-747.
- McGlashan, J.K., Loudon, F.K., Thompson, M.B., & Spencer, R.J. (2015). Hatching behavior of eastern long-necked turtles (*Chelodina longicollis*): The influence of asynchronous environments on embryonic heart rate and phenotype. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 188, 58-64.
- McGlashan, J.K., Spencer, R.J., & Old, J.M. (2012). Embryonic communication in the nest: metabolic responses of reptilian embryos to developmental rates of siblings. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279(1734), 1709-1715.

- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., & Marmolejo-Valencia, A. (2010). Gonadal morphogenesis and gene expression in reptiles with temperature-dependent sex determination. *Sexual Development*, 4(1-2), 50-61.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramirez, S., Moreno-Mendoza, N., & Marmolejo-Valencia, A. (1997). Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and comparative endocrinology*, 107(3), 373-385.
- Miller, J.D. (1985). Embryology of marine turtles. In 'Biology of the Reptilia. Vol. 14' (Eds C. Gans, F. Billet, and P. Maderson.) pp. 269–328.
- Mirmiran, M., Kok, J.H., Boer, K., & Wolf, H. (1992). Perinatal development of human circadian rhythms: role of the foetal biological clock. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16(3), 371-378.
- Mitchell, M.A. (2009). Reptile cardiology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 12(1), 65-79.
- Ono, H., Hou, P.C.L., & Tazawa, H. (1994). Responses of developing chicken embryos to acute changes in ambient temperature: noninvasive study of heart rate. *Israel Journal of Zoology*, 40(3-4), 467-479.
- Packard, G.C., & Packard, M.J. (1988). The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. *Biology of the Reptilia*, 16, 523-605.
- Packard, G.C., Miller, K., & Packard, M.J. (1993). Environmentally induced variation in body size of turtles hatching in natural nests. *Oecologia*, 93(3), 445-448.
- Pike, D.A. (2014). Forecasting the viability of sea turtle eggs in a warming world. *Global change biology*, 20(1), 7-15.
- Poloczanska, E.S., Limpus, C.J., & Hays, G.C. (2009). Vulnerability of marine turtles to climate change. *Advances in marine biology*, 56, 151-211.
- Read, T., Booth, D.T., & Limpus, C.J. (2013). Effect of nest temperature on hatchling phenotype of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from two South Pacific rookeries, Mon Repos and La Roche Percée. *Australian journal of zoology*, 60(6), 402-411.
- Reebs, S.G. (2002). Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12(4), 349-371.
- Reece, S.E., Broderick, A.C., Godley, B.J., & West, S.A. (2002). The effects of incubation environment, sex and pedigree on the hatchling phenotype in a natural population of loggerhead turtles. *Evolutionary ecology research*, 4(5), 737-748.

- Rezende, E.L., Castañeda, L.E., & Santos, M. (2014). Tolerance landscapes in thermal ecology. *Functional Ecology*, 28(4), 799–809.
- Sartori, M.R., Abe, A.S., Crossley, D.A., & Taylor, E.W. (2017). Rates of oxygen uptake increase independently of changes in heart rate in late stages of development and at hatching in the green iguana, *Iguana iguana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 205, 28-34.
- Sartori, M.R., Taylor, E.W., Abe, A.S., & Crossley, D.A. (2015). An appraisal of the use of an infrared digital monitoring system for long-term measurement of heart rate in reptilian embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 188, 17-21.
- Scudiero, R., Esposito, M.G., & Simoniello, P. (2014). 2 Tolerance to thermal stress in lizards embryos. *Lizards: Thermal Ecology, Genetic Diversity and Functional Role in Ecosystems*. 29-44.
- Segura, L.N., & Cajade, R. (2010). The effects of sand temperature on pre-emergent green sea turtle hatchlings. *Herpetological Conservation and Biology*, 5(2), 196-206.
- Siddiqui, W.H., Barlow, C.A., & Randolph, P.A. (1973). Effects of some constant and alternating temperatures on population growth of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *The Canadian Entomologist*, 105(1), 145-156.
- Spencer, R.J., & Janzen, F.J. (2011). Hatching behavior in turtles. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 100–110.
- Spencer, R.J., Thompson, M.B., & Banks, P.B. (2001). Hatch or wait? A dilemma in reptilian incubation. *Oikos*, 93(3), 401-406.
- Stillman, J., & Somero, G. (1996). Adaptation to temperature stress and aerial exposure in congeneric species of intertidal porcelain crabs (genus *Petrolisthes*): correlation of physiology, biochemistry and morphology with vertical distribution. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1845-1855.
- Tedeschi, J.N., Kennington, W.J., Tomkins, J.L., Berry, O., Whiting, S., Meekan, M.G., & Mitchell, N.J. (2016). Heritable variation in heat shock gene expression: a potential mechanism for adaptation to thermal stress in embryos of sea turtles. *Proc. R. Soc. B*. 283: 20152320.
- Telemeco, R.S., Warner, D.A., Reida, M.K., & Janzen, F.J. (2013). Extreme developmental temperatures result in morphological abnormalities in painted turtles (*Chrysemys picta*): a climate change perspective. *Integrative zoology*, 8(2), 197-208.

- Thompson, M.B. (1988). Nest temperatures in the pleurodiran turtle, *Emydura macquarii*. *Copeia*, 996-1000.
- Thompson, M.B. (1989). Patterns of metabolism in embryonic reptiles. *Respiration physiology*, 76(2), 243-255.
- Tosini, G., & Menaker, M. (1996). The pineal complex and melatonin affect the expression of the daily rhythm of behavioral thermoregulation in the green iguana. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 179(1), 135-142.
- Tosini, G., Bertolucci, C., & Foà, A. (2001). The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiology & behavior*, 72(4), 461-471.
- Valverde, R.A., Wingard, S., Gómez, F., Tordoir, M.T., & Orrego, C.M. (2010). Field lethal incubation temperature of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryos at a mass nesting rookery. *Endangered Species Research*, 12(1), 77-86.
- van Lohuizen, S., Rossendell, J., Mitchell, N.J., & Thums, M. (2016). The effect of incubation temperatures on nest success of flatback sea turtles (*Natator depressus*). *Marine Biology*, 163(7), 1-12.
- Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., & Flores, A.A. (2015). Effect of warming rate on the critical thermal maxima of crabs, shrimp and fish. *Journal of thermal biology*, 47, 19-25.
- Webb, G.J., & Witten, G.J. (1973). Critical thermal maxima of turtles: validity of body temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 45(3), 829-832.
- Witt, M.J., Hawkes, L.A., Godfrey, M.H., Godley, B.J., & Broderick, A.C. (2010). Predicting the impacts of climate change on a globally distributed species: the case of the loggerhead turtle. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 901-911.
- Wood, A., Booth, D.T., & Limpus, C.J. (2014). Sun exposure, nest temperature and loggerhead turtle hatchlings: Implications for beach shading management strategies at sea turtle rookeries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 451, 105-114.
- Wyneken, J. (2009). Normal reptile heart morphology and function. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 12(1), 51-63.
- Wyneken, J., & Witherington, D. (2001). *The anatomy of sea turtles* (p. 172). National Marine Fisheries Service.

- Yntema, C.L. (1968). A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of morphology*, 125(2), 219-251.
- Zhao, B., Li, T., Shine, R., & Du, W.G. (2013). Turtle embryos move to optimal thermal environments within the egg. *Biology letters*, 9(4), 20130337.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A., & Smith, G.M. (2009). *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. Springer Science.

14. ANEXO

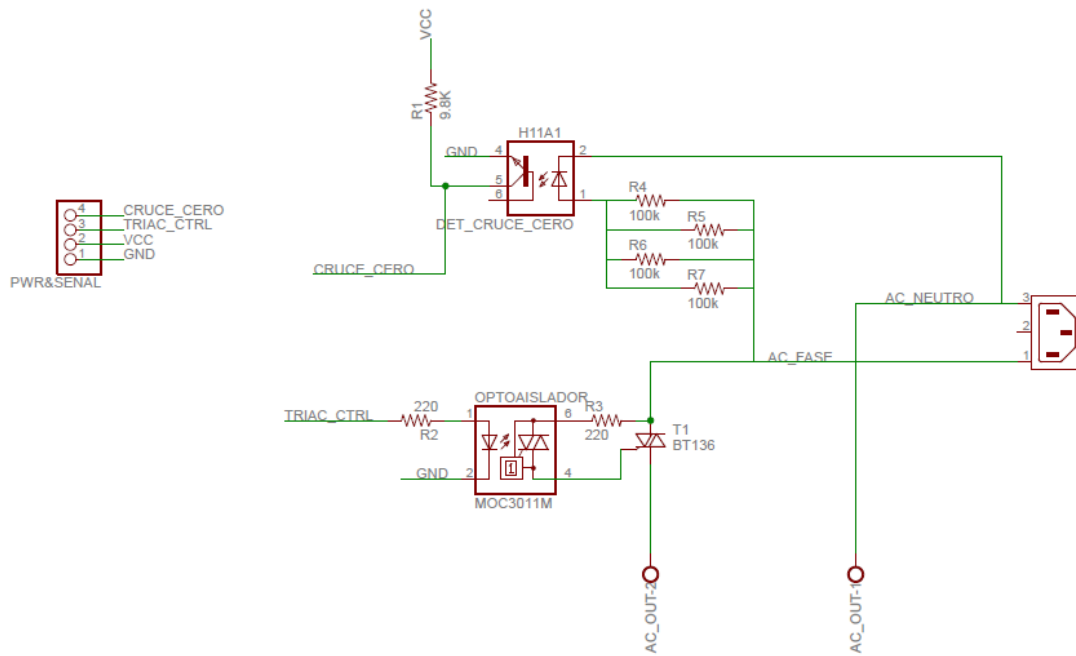


Figura 61. Diagrama del circuito electrónico del controlador de potencia (voltaje) de corriente alterna utilizado para el control de la temperatura en las incubadoras desarrolladas.