



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

**CORRELACIÓN DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN, LA  
EXPRESIÓN DE SOX9 Y LA PROPORCIÓN DE SEXOS EN NIDOS  
DE LA TORTUGA *Lepidochelys olivacea***

**TESIS**

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

PRESENTA:  
**ANDREA HERNÁNDEZ ROMERO**

**TUTOR PRINCIPAL:**  
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**COMITE TUTOR:**  
DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, MAZATLAN  
DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, C.U.

**CD.MX., ABRIL 2018**



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.



**CORRELACIÓN DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN, LA  
EXPRESIÓN DE SOX9 Y LA PROPORCIÓN DE SEXOS EN NIDOS  
DE LA TORTUGA *Lepidochelys olivacea***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

(BIOLOGÍA MARINA)

**PRESENTA:  
ANDREA HERNÁNDEZ ROMERO**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR:**  
Dr. Federico Alberto Abreu Grobois  
Dr. Píndaro Díaz Jaimes  
Dra. Verónica Díaz Hernández  
Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal

**MÉXICO, CD. MX., ABRIL 2018**

## JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA MARÍA DEL CARMEN URIBE ARANZÁBAL

SECRETARIO: DR HORACIO MERCHANT LARIOS

VOCAL: DR FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS

1ER SUPLENTE: DR PÍNDARO DÍAZ JAIMES

2DO SUPLENTE: DRA VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ

## SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## ASESOR DEL TEMA:

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS. INVESTIGADOR EMÉRITO



## SUSTENTANTE:

BIÓLOGA ANDREA HERNÁNDEZ ROMERO





Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Horacio Merchant Larios en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

## **FINANCIAMIENTO Y PERMISOS DE COLECTA**

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento de los siguientes proyectos:

**PAPIIT-UNAM IN201218 Factores Genéticos y Epigenéticos involucrados en la determinación sexual de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.**

## RECONOCIMIENTOS

PAPIIT-UNAM IN202115. La tortuga marina *Lepidochelys olivacea* como modelo de determinación sexual por temperatura: Mecanismos moleculares en condiciones de laboratorio y naturales, a cargo del Dr. Horacio Merchant Larios.

Este trabajo cuenta con el permiso de colecta de huevos de *L. olivacea* otorgado por la SEMARNAT con oficio número SGDP/DGVC/01945/13, SGDP/DGVC/02133/14, SGDP/DGVC/03109/15 y SGPA/DGVS/02522/16.

Este trabajo se realizó con el apoyo coordinado del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT), Mazunte, Oaxaca. Bajo la dirección de la Biól. Erika García Campos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca Nacional otorgada para solventar mi manutención durante 3 semestres de maestría.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación como Maestra en Ciencias.

Al Dr. Horacio Merchant Larios por darme la oportunidad y la confianza para desarrollar este trabajo y todas las enseñanzas que me ayudarán a mi formación como investigadora.

Al M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia, por ser pieza fundamental en este trabajo, por haber apoyado en la obtención de muestras biológicas así como su procesamiento tanto en campo como en el laboratorio.

A la M. en C. Martha Harfush, Investigadora del CMT, por coordinar y participar en la colecta, transporte y disección de muestras biológicas de embriones de tortuga *L. olivacea*.

A la Dra. Tzipe Silvia Govesensky Zack por su apoyo en el análisis estadístico e interpretación de los resultados fundamental para este trabajo.

A la Dra. Verónica Díaz Hernández del departamento de Embriología en la Facultad de Medicina, UNAM, por su apoyo para la realización de la técnica de inmunofluorescencia.

A la M. en I. B. B. Claudia Angélica Garay Canales del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo incondicional para la obtención de suero de conejo y producción de anticuerpos contra la proteína Sox9 empleado para las inmunofluorescencias.

Al Biól. Exp. Gonzálo Asariel Asero Galindo del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su asesoría y apoyo técnico en el análisis de ELISA para la producción de anticuerpos en el suero de conejo.

MVZ. Georgina Díaz Herrera por su apoyo técnico en el manejo y obtención de muestras con los animales de bioterio.

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

Biól. Ángel Guillermo González Padilla por su apoyo y facilidades otorgadas en el Campamento Morro Ayuta para la incubación en corral y toma de muestras biológicas de huevos de *L. olivacea*.

Biól. Erika Peralta Buendía, por la colecta de huevo de tortuga *L. olivacea*.

Biól. Teresa Luna Medina, por la colecta de huevo de tortuga *L. olivacea*.

Al Técnico Anselmo Cervantes Rodríguez por el traslado y transporte de muestras desde el

Aeropuerto al campamento y viceversa.

Biól. Andrés Mariano Alcántara, por la colecta de huevo de tortuga *L. olivacea*.

Biol. Luis Javier Chino Palomo por el apoyo en los muestreos en campo y toma de muestras.

Pasante de Biología. Roberto Cruz Alcántara por el apoyo en la toma de fotografías del material biológico.

## **DEDICATORIA**

Quiero agradecer a mi madre, padre y hermana por el amor y apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

A Alfredo Perea por darme la mano en este camino.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Alex Marmolejo, Rogelio Montiel, Paulina Ortega, Pedro Collazo, Luis Chino, Adriana Castro y Roberto Cruz por siempre hacer el trabajo en laboratorio divertido.

A mis amigos y compañeros del Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología: Víctor Salinas, Alma Vázquez, y Joss Álvarez, que bueno fue toparnos en el salón de clases.

A mis amigas Graciela Salazar, Karina Mendoza y Andrea Pous por creer en lo fuerte que somos.

Los resultados del presente trabajo de tesis fueron presentados en el 1er Congreso Internacional de Áreas Naturales Protegidas celebrado el 10 y 11 de noviembre del 2016 en la Ciudad de México; con el cartel titulado “Correlación de la temperatura y la proporción de sexos mediante técnicas histológicas en nidos de corral de la tortuga *Lepidochelys olivacea*” y en el 37th Annual Symposium on the Sea Turtle Biology and Conservation celebrado del 15 al 20 de abril de 2017 en Las Vegas, Nevada; con el trabajo titulado “Gonadal SOX9 Expression, Nest Temperature and Sex Ratio in the Olive Ridley *Lepidochelys olivacea*”.

# ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	2
INDICE DE TABLAS	4
RESÚMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	28
• LA EXPRESIÓN DE SOX9 SEGÚN LA ETAPA DE DESARROLLO	28
• PERFILES DE TEMPERTURA DE LOS NIDOS CUYA EXPRESIÓN DE SOX9 FUE ANALIZADA	36
• PERFILES DE TEMPERATURA Y PROPORCIÓN DE SEXOS EN EL TOTAL DE NIDOS ESTUDIADOS	39
• ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
• TEMPERATURA PIVOTE (TP)	47
• RANGO DE TEMPERATURA DE TRANSICIÓN (TRT, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS: TRANSITIONAL RANGE OF TEMPERATURE)	47
DISCUSIÓN	49
• EXPRESIÓN DE SOX9	49
• PROPORCIONES SEXUALES OBSERVADAS EN MORRO AYUTA	53
• FLUCTUACIONES DIARIAS	54
• PERIODO TERMO-SENSIBLE (PTS)	54
• TEMPERATURA PIVOTE	57
• INTERVALO DE TEMPERATURA DE TRANSICIÓN (TRT, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)	59
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63

# INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de distribución en aguas y anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> . El área marcada con diagonales representa las zonas donde la tortuga golfina se alimenta, reproduce o migra en el mar.....	7
<b>Figura 2.</b> Relación entre las etapas y días de desarrollo de embriones de <i>L. olivacea</i> incubados a 26°C o 33°C (Merchant-Larios et al., 2010).....	12
<b>Figura 3.</b> Tasa de desarrollo de embriones de <i>L. olivacea</i> a temperaturas masculinizantes (TM) y feminizantes (TF). Se consideran las características para tortugas marinas propuesto por Miller (1985), en el cual <i>L. olivacea</i> fue omitida. Et, etapa. Barra, 2cm (Imágenes tomadas de Merchant et al., 1997). .....	12
<b>Figura 4.</b> Niveles de expresión de Sox9 en gónadas incubadas a temperatura feminizante (TF) y masculinizante (TM) en etapas 23 a 27. Se utilizó $\beta$ -actina como control endógeno para relacionar la expresión de Sox9 con la temperatura y mostrar como Sox9/ $\beta$ -actina el resultado. (Torres Maldonado et al. 2003). .....	15
<b>Figura 5.</b> Parte del epitelio celómico (señalado con flechas) a un costado del mesenterio intestinal recién formado (hm). Un dominio de células epiteliales con células positivas a la expresión de SOX9 (rojo) y a la Citoqueratina (verde). Empleada como marcador de las células epiteliales. Los núcleos de todas las células (epiteliales y estromáticas) están marcados con TOTO-3 yodide. Escala 20 $\mu$ m (azul). (Imagen tomada de Díaz-Hernández et al. 2012).....	16
<b>Figura 6.</b> Imagen confocal mostrando parte del dominio T en etapa 21. Mesenterio intestinal (hm), Epitelio superficial (se), Cresta gonadal (gr). Escala 20 $\mu$ m. Imagen tomada de (Díaz-Hernández et al. 2012).....	17
<b>Figura 7.</b> Estados transitorios involucrados en el origen de la gónada bipotencial en <i>L. olivacea</i> .....	18
<b>Figura 8.</b> Calibración de los termómetros. Gráfico con promedios de las temperaturas registrado por los 16 HOBOs de manera simultánea. La variación entre ellos fue mínima.....	24
<b>Figura 9.</b> Gráfica de Barras con el número de nidos muestreados a lo largo de 3 años de trabajo en la playa Morro Ayuta y La Escobilla. ....	25
<b>Figura 10.</b> Inmunofluorescencia de gónadas bipotenciales del Lote 5 Nido 4 (diciembre 2015) muestreados a los 18 días, etapa 24.....	28
<b>Figura 11.</b> Inmunofluorescencia de gónadas bipotenciales del Lote 7 (septiembre 2016) muestreados a los 18 días, etapa 24.....	29
<b>Figura 12.</b> Inmunofluorescencia de “testículos potenciales” del Lote 5 Nido 4 (diciembre 2015) muestreados a los 23 días (etapa 25).....	30
<b>Figura 13.</b> Inmunofluorescencia de “testículos potenciales” del Lote 7, Nido 1 (diciembre 2015) muestreados a los 23 días (etapa 25) .....	31
<b>Figura 14.</b> Inmunofluorescencia de “ovarios potenciales” del Lote 5, Nido 1 (Diciembre 2015) muestreados a los 23 días (etapa 25).....	31
<b>Figura 15.</b> Inmunofluorescencia de “ovarios potenciales” del Lote 7 (septiembre 2016) muestreados a los 23 días (etapa 25).....	32
<b>Figura 16.</b> Inmunofluorescencia de testiculos del Lote 5 (diciembre 2015), muestreados a los 28 días (etapa 25).....	33

<b>Figura 17.</b> Inmunofluorescencia de ovarios del Lote 5 (diciembre 2015) y Lote 7 (septiembre 2016), muestreados a los 28 días (etapa 25).....	<b>34</b>
<b>Figura 18.</b> Gráfico con promedio de temperaturas registradas diariamente, desde el día 1 al día 38 del desarrollo.....	<b>37</b>
<b>Figura 19.</b> Promedio de temperaturas diarias registradas desde el día 1 al día 38 de desarrollo.....	<b>37</b>
<b>Figura 20.</b> Etapas de desarrollo de los embriones de <i>L. olivacea</i> obtenidas de nidos incubados en playa correspondientes al muestreo PML5 .....	<b>38</b>
<b>Figura 21.</b> Etapas de desarrollo de los embriones de <i>L. olivacea</i> obtenidas de nidos incubados en playa correspondientes al muestreo PML7 .....	<b>38</b>
<b>Figura 22.</b> Gráficas de las temperaturas promedio, mínimas y máximas diarias por lote, anotando el porcentaje de hembras en cada lote.....	<b>41</b>
<b>Figura 23.</b> Gráficas de las temperaturas promedio, mínimas y máximas diarias por lote, anotando el porcentaje de hembras en cada lote. (eliminando los datos de PMLAN3 y PML6N1).....	<b>43</b>
<b>Figura 24.</b> Regresión No Lineal entre proporciones sexuales y promedio de temperaturas de 43 nidos sembrados en la playa Morro Ayuta y La Escobilla.....	<b>45</b>
<b>Figura 25.</b> Regresión No Lineal entre proporciones sexuales y promedio de temperaturas de 41 nidos sembrados (eliminando PMLAN3 y PML6N1) en la playa Morro Ayuta.....	<b>46</b>
<b>Figura 26.</b> Proporciones sexuales observadas en Playa Morro Ayuta durante 3 temporadas.....	<b>53</b>
<b>Figura 27.</b> Gráfico comparativo del PTS basado en experimentos de intercambio en diversas especies de tortugas.....	<b>55</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Correlación entre la edad cronológica y la etapa de desarrollo a temperaturas masculinizantes (TM) y feminizantes (TF), (Merchant et al., 2010). .....	<b>11</b>
<b>Tabla 2.</b> Detección de SOX9 durante tres etapas del desarrollo y proporción de sexos en etapas cercanas a la eclosión. En cada nido se analizó la expresión de SOX9 en 2 a 5 embriones por etapa.....	<b>36</b>
<b>Tabla 3.</b> Fechas de lotes en playa Morro Ayuta y La Escobilla. ....	<b>39</b>
<b>Tabla 4.</b> Nidos de Playa Morro Ayuta: Proporciones sexuales y promedios de temperatura.....	<b>40</b>
<b>Tabla 5.</b> Temperaturas promedio, mínimos y máximos durante los días 17-23 de incubación en los 11 lotes analizados.....	<b>44</b>
<b>Tabla 6.</b> Comparación de TRT y TP obtenidos por diferentes métodos para la tortuga <i>L. olivacea</i> .....	<b>60</b>

## RESÚMEN

Los huevos de *L. olivacea* incubados a temperatura constante encontraron que a 26°C y a 33°C, el 100% de las crías son machos o hembras, respectivamente. La determinación del sexo ocurre en la gónada morfológicamente indiferenciada (formada durante las etapas 22-25) que luego se diferencia como testículo u ovario. SOX9 es un factor de transcripción involucrado en el proceso de la diferenciación del sexo gonadal en Amniota. Las gónadas indiferenciadas de *L. olivacea* expresan SOX9 en cordones medulares independientemente de la temperatura de incubación. A partir de entonces, este gen está regulado dimórficamente: su expresión se mantiene a 26°C y disminuye hasta apagarse a 33°C. Éste proceso ocurre antes de la diferenciación de los testículos u ovarios, SOX9 es un marcador para la determinación del sexo gonadal. Se ha supuesto que el período termo-sensible (PTS) en las tortugas marinas corresponde al segundo tercio del tiempo de incubación total; los experimentos de laboratorio en golfina sugieren que el PTS es considerablemente más corto. Comparamos nuestros resultados de laboratorio con los de la playa. La investigación se llevó a cabo en la playa de Morro Ayuta, Oaxaca, México; con nidos de corral. Los sensores de temperatura (HOBO) se colocaron en el centro de 43 nidos reubicados. Díez de estos nidos se analizaron en los días 18, 23 y 28, según las siguientes medidas: (1) Perfil de temperatura. (2) expresión Gonadal SOX9. (3) Etapa de desarrollo, y (4) Proporción de sexo. RESULTADOS: Los embriones muestreados a los 18, 23 y 28 días, se encontraban en las etapas 24, 25 y 26, respectivamente. Todas las gónadas en la etapa 24 expresaron SOX9 en los núcleos celulares de los cordones medulares. Sin embargo, de los embriones analizados en la etapa 25, encontramos gónadas con numerosas células positivas, mientras que en otras gónadas encontramos células positivas y negativas a la expresión de SOX9. En la etapa 26, los testículos u ovarios diferenciados fueron SOX9 positivos o negativos, respectivamente. En los embriones muestreados en los 43 nidos analizados, la proporción de sexos se correlacionó con la temperatura media monitoreada durante 18-25 días. La producción masculina fue del 100% en 9 nidos (31.07 / 30.44°C). En 7 nidos, la proporción de sexos fue muy variable (31.52 / 30.60 ° C). Además, la producción femenina fue del 100% en 10 nidos (34.82 / 32.6 ° C).

CONCLUSIÓN: La regulación dimórfica de SOX9 sugiere fuertemente que el período de TSD toma alrededor de 7 días, una duración casi la mitad de la propuesta anteriormente que era la totalidad del segundo tercio de la incubación.

## ABSTRACT

Eggs of *L. olivacea* incubated at constant temperature found that at 26°C and 33°C produce 100% of hatchlings are male or female, respectively. Sex determination occurs in the morphologically undifferentiated gonad (formed during stages 22-25) which then, differentiates either as testis or ovary. SOX9 is a transcription factor involved in gonadal sex differentiation in Amniota. Undifferentiated gonads of *L. olivacea* express SOX9 in medullary cords regardless the incubation temperature. Thereafter, this gene is dimorphically regulated: its expression is maintained at MPT and down regulated at FPT. Since this process occurs prior to differentiation of testes or ovaries, SOX9 is an earlier marker than histology for gonadal sex determination. It has been assumed that the thermo-sensitive period (TSP) in sea turtles corresponds to the second third of the total incubation time; the laboratory experiments in the Olive Ridley suggest that the TSP is considerably shorter. Here, we compared our laboratory results with those in the beach. To our knowledge this is the first time that a direct comparative study has been undertaken in a sea turtle. The research took place at Morro Ayuta beach, Oaxaca, Mexico; in a small hatchery located near the natural nesting place. Temperature sensors (HOBO) were placed in the center of 43 relocated nests. Ten of these nests were analyzed at days 18, 23 and 28, per the following measures: (1) Temperature profile. (2) Gonadal SOX9 expression. (3) Developmental stage, and (4) Sex Ratio. RESULTS: Embryos sampled at 18, 23 and 28 days, were at stages 24, 25 and 26, respectively. All gonads at stage 24, expressed SOX9 in cell nuclei of medullary cords. However, of the embryos analyzed in stage 25, we found gonads with numerous positive cells whereas in other gonads we found positive and negative cells to SOX9 expression. At stage 26, differentiated testes or ovaries were SOX9 positive or negative, respectively. Sex ratio was correlated with the mean temperature monitored during 18-25 days in the 43 nests analyzed. Male production was 100% in 9 nests (31.07/30.44°C). In 7 nests sex ratio was highly variable (31.52/30.60°C). Moreover, female production was 100% in 10 nests (34.82/32.6°C).

CONCLUSION: The dimorphic regulation of SOX9 strongly suggests that the period for TSD takes around eight days which is almost half the second third of incubation time previously proposed.

## INTRODUCCIÓN

La golfinia, es la tortuga marina más pesada que hay en el Océano Pacífico (Márquez, 1996). Es ligeramente mayor que la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) del Golfo de México (Jones and Seminoff 2013). Así mismo, es la tortuga marina más abundante en el mundo; por lo cual, la IUCN (Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) considera a la tortuga golfinia como una especie amenazada, pero aún no en peligro de extinción.

El cortejo y la cópula se dan en el mar, por lo general cerca de la costa, esto ocurre durante la primavera e inicios del verano. La hembra puede almacenar el esperma del macho y usarlo a lo largo de la época de reproducción. La ovoposición se presenta de junio a diciembre, cientos de hembras llegan simultáneamente a las mismas costas a desovar, fenómeno conocido como “arribada”. Cada hembra desova en un nido de 30 a 55 cm de profundidad, durante las noches, la golfinia puede desovar varias veces en un ciclo. El número de huevos depositados por nidada puede ser de hasta 160, con una media de alrededor de 105, esto puede variar entre localidades (Parque Nacional Lagunas de Chacahua, 2008).

Las playas de anidación para esta especie se encuentran en el Pacífico oriental, Atlántico del Sur, norte del Océano Índico y Pacífico occidental (Fig. 1).

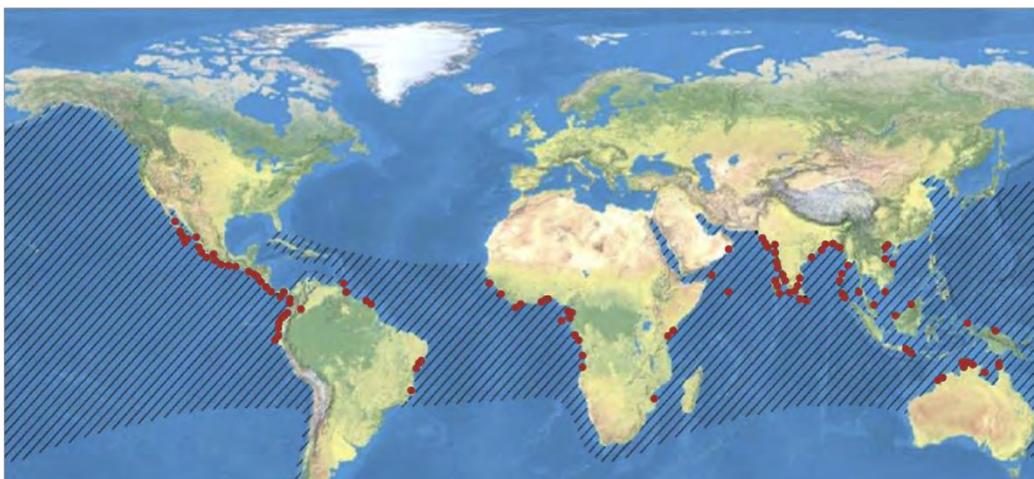


Figura 1. Mapa de distribución en aguas y anidación de *Lepidochelys olivacea*. El área marcada con diagonales representa las zonas donde la tortuga golfinia se

alimenta, reproduce o migra en el mar. Los puntos rojos marcan sitios donde se han registrado anidaciones hasta el año 2010 (Imagen modificada de (Wallace et al. 2010).

Aunque en la mayoría de las playas ocurren anidaciones solitarias o en pequeños grupos, en algunos sitios de la India, Costa Rica y México, ocurren arribadas de varios miles de hembras que participan en anidaciones masivas simultáneamente (Pritchard et al., 1983; Pritchard & Mortimer, 1999). En el Pacífico mexicano ocurren principalmente en las costas de Guerrero, Jalisco y Oaxaca de las cuales la playa más importante por el número de anidaciones corresponde a La Escobilla en Oaxaca.

La determinación sexual en los vertebrados ha evolucionado siguiendo múltiples modalidades. En términos generales pueden agruparse en dos grandes grupos: con determinación sexual genética (DSG) y con determinación sexual ambiental (DSA). El descubrimiento que la temperatura promueve el desarrollo de uno u otro sexo (Determinación Sexual por Temperatura, DST), inició una nueva área de investigación en la biología evolutiva y del desarrollo. Varias especies de vertebrados son vulnerables al efecto promotor del sexo por temperatura durante un periodo crítico del desarrollo gonadal. Los reptiles presentan algunas de las variaciones más extraordinarias en la estructura de los cromosomas sexuales y los patrones de determinación del sexo (Valenzuela, 2004). Aunque los genes involucrados en la determinación sexual de la gónada en vertebrados Amniota son altamente conservados tanto en especies con DSG como con DST (Kohno et al. 2014), las redes de expresión espacio-temporal en que participan, han evolucionado considerablemente (Davidson & Erwin 2006). De manera que el estudio de una especie con DST, por su carácter predictivo, resulta un buen modelo para elucidar la evolución de las redes genéticas involucradas en la determinación sexual en los vertebrados Amniota. Sin embargo, las bases de la determinación y diferenciación sexual en reptiles aún siguen siendo estudiadas. No se ha encontrado un gen sexual maestro en ningún reptil con determinación sexual genética por lo tanto todavía no hay un modelo de expresión como lo es el humano, el ratón y el pollo; los modelos en los cuales se han silenciado genes o empleado técnicas diferentes que ayuden a elucidar las cadenas de expresión. Gracias a esto se han presentado mayor número de complicaciones al momento

de entender y estudiar un sistema de determinación sexual ambiental como es el caso de la temperatura (Smith et al. 2007; Wilhelm, Palmer, & Koopman 2007).

La determinación sexual ambiental es un ejemplo de plasticidad en un carácter fenotípico discreto. Especies con DST estricta difieren fundamentalmente de aquellos con DSG en que el fenotipo de los machos y las hembras no tienen diferencias consistentes entre su genotipo (Georges et al. 2010).

Es probable que los reptiles, más que otros vertebrados, son desafiados particularmente por el ambiente térmico en el cual los embriones se desarrollan. En el caso de los mamíferos, los embriones se mantienen a temperaturas constantes gracias a su capacidad homeotérmica al momento de determinarse el sexo. Aunque en las aves no se controla dicha temperatura durante cada momento del desarrollo; sí se mantiene dentro de rangos muy cercanos gracias a la incubación de los huevos que están en contacto directo con la madre durante la mayor parte del desarrollo (White & Kinney, 1974). En contraste, el embrión del reptil tiene que tolerar un amplio rango de temperaturas a lo largo de su desarrollo, incluyen las etapas críticas donde ocurre la determinación sexual. El ambiente térmico que se genera en cada nido varía según dónde y cuándo fue puesto. Las temperaturas cambian año con año y a lo largo de una temporada. Incluso fluctuaciones diarias pueden ser importantes (Pieau, 1982).

Dentro de rangos de temperatura compatibles con la viabilidad, hay tres patrones de determinación sexual: 1. M-F. Temperaturas altas promueven el nacimiento de hembras y las temperaturas bajas favorecen la eclosión de machos. 2. F-M. En otras especies ocurre lo contrario, las temperaturas altas son masculinizantes (T-M) y las bajas son feminizantes (TF). 3. F-M-F. Temperaturas bajas son TF, intermedias TM y muy altas son TF. En especies con patrones 1 y 2 hay una temperatura intermedia llamada "pivote" (TP), en la que el porcentaje de sexos que eclosionan es cercano al 50%. Sin embargo, en la modalidad 3 hay dos TPs (Shoemaker & Crews 2009).

En las tortugas marinas, la determinación del sexo por temperatura ha sido encontrada en *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Dermochelys coriacea*, *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempii* y *Eretmochelys imbricata*. La determinación sexual se presenta alrededor del segundo tercio del tiempo total de

incubación (periodo termo-sensitivo: PTS) ( Mrosovsky & Pieau, 1991) y la temperatura de incubación en la cual la proporción sexual resultante en la nidada es de 1:1, se llama temperatura pivote. Experimentalmente, este valor se ha obtenido incubando grupos de huevos a varias temperaturas constantes y determinando la proporción de crías de hembras y machos.

Experimentos en *L. olivacea* con temperaturas masculinizantes (26/27°C) y feminizantes (32/33°C), la duración del desarrollo embrionario es de 75/70 días y 45/50, respectivamente (Merchant-Larios, Diaz-Hernandez, & Marmolejo-Valencia, 2010). Sin embargo, hay pocos estudios analizando directamente la temperatura en nidos desarrollados en condiciones naturales. Una serie de factores poblacionales específicos se han descrito que probablemente afecten la temperatura de los nidos y por lo tanto la proporción de sexos de las tortugas marinas. Estos incluyen la variación latitudinal, los cambios estacionales de temperatura, zonas bajo sombra por vegetación en playa, el color de la arena, eventos periódicos como la lluvia, y/o la profundidad de los huevos (Hays, Godley, & Broderick, 1999).

Se asume que el periodo termo-sensible (PTS) en que ocurre la determinación sexual por temperatura, abarca alrededor del segundo tercio de la duración total de la incubación. El PTS corresponde a las etapas de desarrollo en las cuales un grupo de embriones en el laboratorio o en un nido natural, responden a la temperatura (Yntema, 1979). Sin embargo, esta definición no especifica la edad en que cada embrión dentro del grupo, responde a la temperatura de manera individual en el nido. En 2010 Merchant-Larios y colaboradores, realizaron experimentos de incubación a 26° y 33°C en *L. olivacea* y observaron que casi el 100% de los embriones incubados al inicio del desarrollo, a una temperatura feminizante (TF, 33°C), responden a un cambio de temperatura masculinizante (TM, 26°C) en la etapa 24, desarrollando testículos; solo el 30% respondieron en la etapa 25 y ninguno en la etapa 26. Por otro lado, todos los embriones incubados a TM al inicio del desarrollo, responden al cambio a TF en la etapa 23, desarrollando ovarios; alrededor del 35% respondieron al cambio en la etapa 24 y ninguno en la etapa 25 (Merchant-Larios, Diaz-Hernandez, & Marmolejo-Valencia, 2010). Merchant-Larios et al., consideraron las etapas de desarrollo descritas por

Miller (1985), quien no incluyó a *L. olivacea*, se describieron las etapas basadas en varios detalles morfológicos de las tortugas marinas.

Tabla 1. Correlación entre la edad cronológica y la etapa de desarrollo a temperaturas masculinizantes (TM) y feminizantes (TF), (Merchant-Larios, et al., 2010).

Intercambio	Días de incubación	Etapas	Huevos	Hembras	Machos	Respuesta al cambio de temperatura (%)
TM a TF	19	20/21	8	8	0	100
	25	21/22	5	5	0	100
	27	23	12	11	1	91
	31	23.5	26	8	18	31
	34	24	14	0	14	0
	38	25	9	0	9	0
TF a TM	19	24	14	0	14	100
	22	24/25	22	20	2	9
	25-27	25	33	33	0	0
	28	26/27	9	9	0	0

Este experimento fue similar al realizarlo a 27°C y 32°C (Merchant-Larios, 1997), en el cual se denominó un periodo indeterminado (PI) en el que todos los embriones respondieron al cambio de temperatura; periodo sensible a la temperatura (PST), donde un porcentaje decreciente responde al cambio y el periodo de sexo determinado (PSD), donde el sexo de los embriones ya no responde al cambio y se desarrollan según la temperatura a la cual fueron incubados al inicio del desarrollo; temperatura feminizante (TF) o temperatura masculinizante (TM). La duración de estos periodos difiere según los grados de TF y TM empleadas en los experimentos (Fig. 2) (Merchant-Larios et al., 1997: 2010). Además, se observa que a temperaturas feminizantes los embriones se desarrollan más rápidamente que los incubados a temperaturas masculinizantes (Fig. 3).

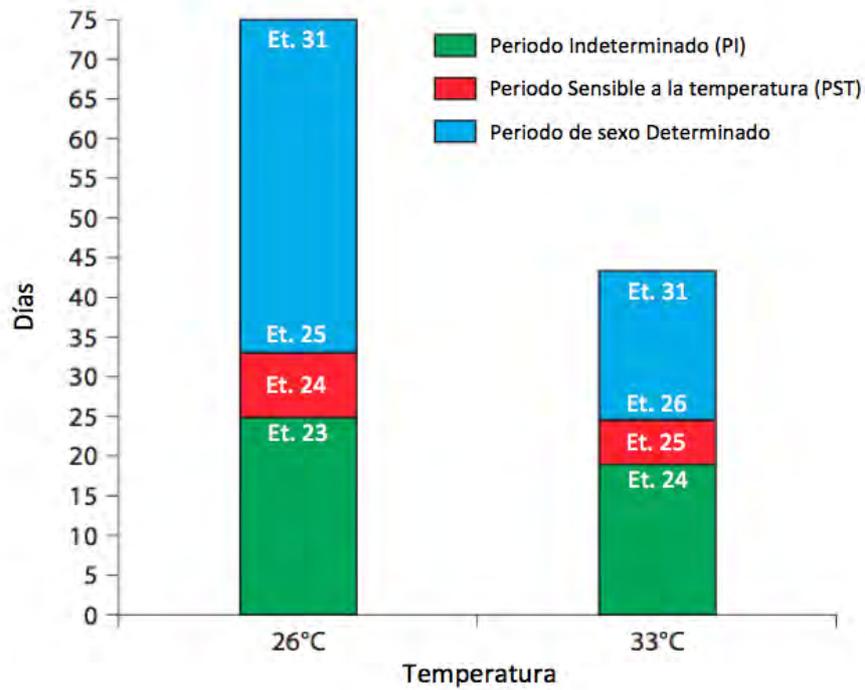


Figura 2. Relación entre las etapas y días de desarrollo de embriones de *L. olivacea* incubados a 26°C o 33°C. Se muestran los periodos en los cuales los embriones responden a cambios de temperatura (Et, etapa de desarrollo), (Merchant-Larios et al., 2010).

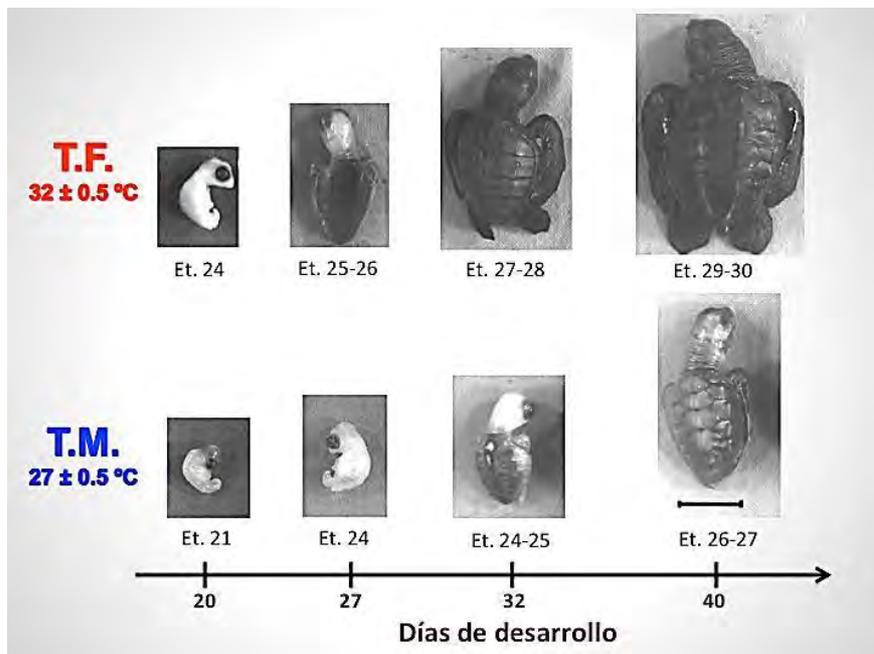


Figura 3. Tasa de desarrollo de embriones de *L. olivacea* a temperaturas masculinizantes (TM) y feminizantes (TF). Se consideran las características para

tortugas marinas propuesto por Miller (1985), en el cual *L. olivacea* fue omitida. Etapa. Barra, 2cm (Imágenes tomadas de Merchant et al., 1997).

Para poder entender esta respuesta al ambiente, se ha estudiado no solo el embrión, sino la expresión de genes y el arreglo celular que presenta a gónada desde que se está formando, en etapas bipotenciales y hasta la eclosión.

Utilizando técnicas histológicas se describió el arreglo celular y tisular en testículos y ovarios de crías de *L. olivacea*. Por ejemplo; en machos, el epitelio superficial es plano, monoestratificado y frecuentemente contiene varias células germinales. Los cordones medulares aparecen separados del epitelio superficial, aunque algunos permanecen adjuntos a él. Los cordones medulares, rodeados por una membrana basal, se forman por un tipo de células epiteliales con abundantes gotas de lípidos. Las células germinales son escasas y no hay lumen en los cordones medulares que pueda justificar el nombre de “tubos seminíferos”; el término correcto debe de ser “cordones seminíferos”. Entre estas formaciones y bordeando el epitelio superficial está una membrana basal y abundante tejido estromático, formado en gran parte por matriz extracelular, células fibroblásticas y vasos sanguíneos. Los ovarios se distinguen por un engrosamiento conspicuo del epitelio superficial. Éste aparece como un epitelio columnar, con una o más células de espesor. Contiene una membrana basal gruesa que separa el epitelio superficial de la región medular de la gónada. Los cordones medulares son vestigiales y aparecen como pequeños grupos de células epiteliales rodeadas de una membrana basal. El tejido estromático es abundante en la región medular (Eckert et al. 2000).

En el proceso de determinación y diferenciación sexual por temperatura se ven involucrados una gran cantidad de genes, entre ellos el gen *Sox9*.

En el presente trabajo nos referimos al gen con la siguiente nomenclatura: *Sox9* y a la proteína como: SOX9.

Dicho gen se describió por el estudio en pacientes con displasia campomélica, un síndrome de malformaciones esqueléticas que se asocia con reversión sexual. Las alteraciones se asocian con translocaciones en el cromosoma 17 humano en 17q24.1 a 17q25.1 (Morais da Silva et al., 1996). El análisis molecular reveló que se trataba de un gen relacionado con el gen *Sry*, al cual se le denominó *Sox9*,

también relacionado con la diferenciación gonadal (Foster et al., 1994). Sox9 es un factor de transcripción pleiotrópico, involucrado en el desarrollo de varios tejidos incluyendo el tubo neural, notocorda y mesonefros (Guth & Wegner, 2008).

Se confirmó que la regulación dimórfica de la expresión de Sox9, participa en el proceso de determinación y/o diferenciación gonadal, mostrando un patrón de expresión diferente entre las gónadas de ambos sexos en diversas especies de vertebrados (Jakob & Lovell-Badge, 2011; Merchant-Larios, Díaz-Hernández, & Marmolejo-Valencia, 2010; Morais da Silva et al., 1996).

En el ratón, se observan desde los 10.5 días post coito (dpc) en ambos sexos. A los 11.5 dpc sólo hay expresión en machos y de los 12.5 a 13.5 dpc la expresión se localiza en las células somáticas de los cordones sexuales en los testículos (Morais da Silva et al., 1996). En el pollo, se ha observado su expresión en ambos sexos en etapas tempranas (etapa 28). A partir de la etapa 32 sólo se observó su expresión en embriones ZZ, lo que demostró también que en las aves tiene un papel importante en la diferenciación testicular (Morais da Silva et al., 1996).

En la tortuga dulceacuícola *T. scripta* se analizaron complejos urogenitales durante el periodo sensible a la temperatura (etapas 12 a la 20) en embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C) y feminizante (31°C). El nivel de expresión en ambos grupos es similar hasta la etapa 19, aumentando la expresión en los embriones de 26°C en la etapa 20. Estos datos muestran que Sox9 podría tener un papel en la formación de testículo en esta especie (Wibbels, Cowan, & LeBoeuf, 1998).

En el cocodrilo americano *A. mississippiensis* se ha reportado la expresión de SOX9 sólo en gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante (33°C), mientras que a temperaturas feminizantes (30°C o 34.5°C), Sox9 se expresa en niveles basales en todas las etapas (Western et al., 1999).

A pesar de ser un gen altamente conservado, las redes de expresión espacio-temporales en cada grupo de organismos, han evolucionado de maneras muy diversas. Por ejemplo, en mamíferos aumenta la expresión de Sox9 antes de la expresión de *Amh* ( que codifica la hormona antimulleriana) (De Santa Barbara et al., 1998). En aves y cocodrilos ocurre lo contrario, Sox9 aumenta su nivel de

expresión después de la expresión de *Amh* y la diferenciación morfológica de los cordones testiculares (Oreal et al., 1998; Western et al., 1999).

Los hallazgos moleculares sugieren que en *L. olivacea*, el testículo es el que se determina de forma constitutiva, porque no hay una diferencia en la expresión del gen *Sox9* con respecto a la gónada bipotencial. Mediante técnicas de RT-PCR, se detectaron transcritos de *Sox9* a ambas temperaturas entre las etapas 23 y 25. En las etapas 25-26 se detectó en 25% de las gónadas a temperatura geminizante (TF) y en todas las gónadas a temperatura masculinizante (TM). A partir de la etapa 26 sólo se detectó en los embriones incubados a TM, mientras que ya no se logró detectar en los embriones incubados a TF (Fig. 4) (Torres Maldonado et al., 2003). Estas observaciones coinciden con estudios donde se analizó por inmunofluorescencia la proteína SOX9 en gónadas de *L. olivacea*, incubadas a TM o a TF. Se observó la presencia de la proteína en ambas temperaturas en los núcleos de células somáticas en los cordones medulares de la gónada hasta la etapa 24 (Moreno-Mendoza et al., 1999).

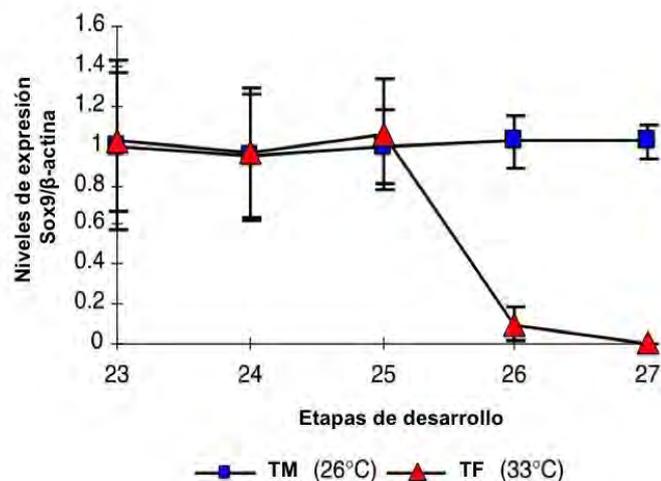


Figura 4. Niveles de expresión de *Sox9* en gónadas incubadas a temperatura feminizante (TF) y masculinizante (TM) en etapas 23 a 27. Las barras en cada punto indican la desviación estándar a partir del punto medio de *Sox9*/ $\beta$ -actina. Se utilizó  $\beta$ -actina como control endógeno para relacionar la expresión de *Sox9* con la temperatura y mostrar como *Sox9*/ $\beta$ -actina el resultado. (Torres Maldonado et al., 2003).

Es importante aclarar que la expresión de dichos genes no está presente en todos los tipos celulares de la gónada descritos. Recientemente se propuso un patrón estructural que describe la especificación dimórfica de las células epiteliales

durante el desarrollo de las gónadas en *L. olivacea*. Así, en la región caudal del mesenterio intestinal, se presenta un dominio de células del epitelio celómico que expresa SOX9 delineando a cada lado, el lugar donde se formarán las crestas genitales. A dicho dominio se le llamó “dominio T”, por su aspecto en cortes transversales de baja amplificación (Fig. 5). Después, por una división asimétrica (Fig. 6), las células que formarán la corteza de la gónada inhiben la expresión de SOX9, en tanto que las que pasan al interior de la cresta genital, mantienen la expresión de SOX9, formando los cordones medulares. Así, queda establecido el patrón estructural epitelial de la gónada bipotencial, en el que las células SOX9 negativas son las precursoras de la corteza que formará el ovario, en tanto que las células SOX9 positivas darán origen al testículo (Fig. 7) (Díaz-Hernández et al., 2012).

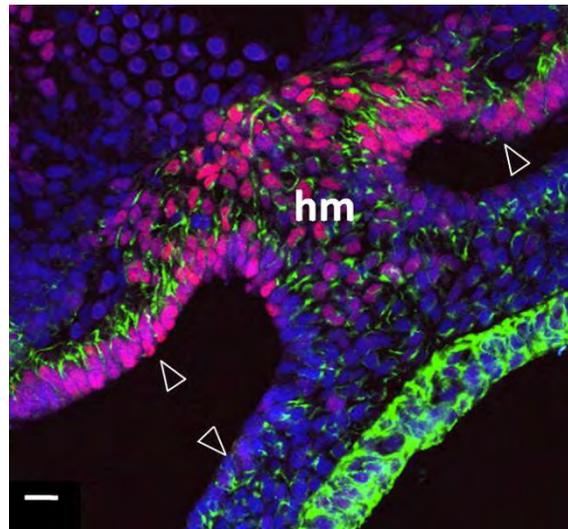


Figura 5. Parte del epitelio celómico (señalado con flechas) a un costado del mesenterio intestinal recién formado (hm). Un dominio de células epiteliales con células positivas a la expresión de SOX9 (rojo) y a la Citoqueratina (verde). Empleada como marcador de las células epiteliales. Los núcleos de todas las células (epiteliales y estromáticas) están marcados con TOTO-3 iodide. Escala 20 $\mu$ m (azul). (Imagen tomada de Díaz-Hernández et al., 2012).

En la etapa 21-22, el dominio T ya tiene los brazos doblados hacia los costados del mesenterio intestinal y dicha zona formada por células SOX9+ y CK+ ha proliferado en gran medida. Por otro lado, la cresta gonadal ya se puede diferenciar una zona que dará lugar a la corteza, formada por células epiteliales y con un menor número de células SOX9+ mientras que las células que formarán la

medula de la gónada mantienen SOX9 expresándose en cada una de ellas (Fig. 6).

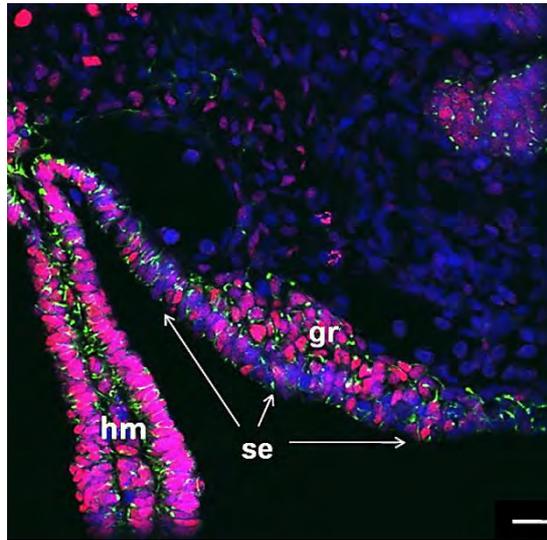


Figura 6. Imagen confocal mostrando parte del dominio T en etapa 21. Mesenterio intestinal (hm), Epitelio superficial (se), Cresta gonadal (gr). Escala 20 $\mu$ m. Imagen tomada de (Díaz-Hernández et al., 2012).

Hasta la etapa 24, los embriones incubados a TM o TF presentaban gónadas con las mismas características morfológica; el epitelio superficial está formado por una o dos capas de células cúbicas SOX9- y en la parte medular, una red de cordones medulares formados por células epiteliales positivas a SOX9 (Díaz-Hernández et al., 2012).

En la etapa 25 empezó a disminuir en las gónadas de embriones incubados a TF, ya que se encontraron sólo algunos núcleos marcados, mientras que se siguió observando en las de los embriones de TM. A partir de la etapa 26, ya no se detectó en las gónadas de TF, y sí en las de TM (Moreno-Mendoza et al., 1999).

En la etapa 28 se pueden distinguir claramente entre gónadas masculinas y femeninas gracias al nivel de expresión dimórfico de SOX9. En testículos, los cordones medulares aun expresaban SOX9 y Citoqueratina y la corteza formada por una capa simple de células positivas a citoqueratina pero negativas a SOX9. Los ovarios presentaban cordones medulares disgregados, negativos a la expresión de SOX9 y positivos para Citoqueratina y la corteza se encontraba engrosada, formada por epitelio pseudoestratificado también positivo a

Citoqueratina y negativo a la expresión de SOX9 y las características morfológicas que presenta cada sexo (Díaz-Hernández et al., 2012).

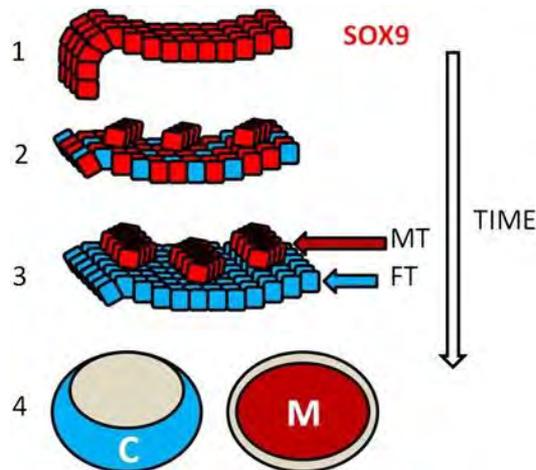


Figura 7. Estados transitorios involucrados en el origen de la gónada bipotencial en *L. olivacea*. Muestra cuatro estados de células epiteliales que regulan la expresión de SOX9 durante la determinación y en la diferenciación gonadal en embriones de *L. olivacea*. 1. La etapa pregonadal es representada por una población de células SOX9+ (rojo) en uno de los brazos del “dominio T”. 2. Una división asimétrica de dichas células da origen a un epitelio superficial formado por células SOX9+ (rojo) y SOX9- (azul). 3. Gónadas bipotenciales con células SOX- (azul) en el epitelio superficial, y células SOX9+ (rojo) en cordones medulares. 4. En una temperatura masculinizante (MT) proliferan las células de la medula y en temperaturas feminizantes (FT) prolifera la corteza. Para esta etapa se establece el marco estructural el cual dará origen a una de las dos redes moleculares que llevan a la gónada bipotencial a diferenciarse en un testículo o un ovario según la temperatura de incubación.

Todas estas observaciones nos indican que en *L. olivacea* la expresión dimórfica del gen Sox9, puede emplearse como marcador para estudiar el efecto de la temperatura durante la diferenciación sexual de la gónada bipotencial. Sin embargo, este tipo de estudios siempre se han realizado en condiciones experimentales en el laboratorio. De manera que, en el presente trabajo, decidimos analizar el patrón de expresión de la proteína codificada por el gen SOX9 en embriones incubados en nidos de playa.

## JUSTIFICACIÓN

La diversidad de respuestas a la temperatura, pone en evidencia la evolución de diferentes estrategias entre especies con DST.

Se ha propuesto la necesidad de estudiar de manera más detallada las proporciones sexuales en condiciones naturales, así como una evaluación detallada de los factores involucrados en la Determinación Sexual por Temperatura entre las poblaciones de tortugas marinas (Ewert et al., 1994; Standora & Spotila 1985). Dicha información es crucial para implementar estrategias que mitiguen los efectos del cambio climático sobre estas poblaciones.

Se han propuesto diversos modelos de predicción de proporciones sexuales en la literatura; sin embargo, los estudios se basan en resultados obtenidos en temperaturas constantes en condiciones controladas del laboratorio, asumiendo al segundo tercio de la duración del desarrollo embrionario, como el periodo termo-sensible (PTS) (Georges et al., 2005; Girondot, 1999; Sandoval, Gómez-Muñoz, & Porta-Gándara, 2017). En estos estudios se estableció la necesidad de obtener más información sobre la correlación entre la temperatura y la proporción de sexos en condiciones naturales, considerando la especie de tortuga marina, para modelar y predecir las proporciones sexuales en cada playa (Mérida et al., 2015; Wibbels, 2003).

Los datos más relevantes para la descripción detallada de la anidación en una playa determinada son los siguientes: a) el Rango de Transición de Temperatura (TRT por sus siglas en inglés, (Nicholas Mrosovsky and Pieau 1991)), el valor teórico donde observamos una proporción sexual 1:1, o Temperatura Pivote (Mrosovsky & Pieau, 1991) (TP) y el Periodo Termo-sensible (PTS), correspondiente al intervalo de tiempo durante el cual, los embriones son susceptibles a los cambios de temperatura y se determina el fenotipo sexual (Mrosovsky & Pieau, 1991).

Hasta la fecha, todos los estudios donde han establecido las proporciones sexuales en función de la temperatura se basan en experimentos realizados en condiciones de laboratorio. De manera que es evidente la necesidad de validar

dichos resultados en condiciones naturales para predecir las proporciones sexuales con mayor precisión.

Los estudios en condiciones naturales tienen importancia ecológica, fisiológica y evolutiva de las tortugas marinas. Es importante tener en cuenta la conservación de estas especies ya que el único método para sexar requiere el sacrificio de las crías. Sin embargo, el muestreo de algunos nidos de la tortuga golfina tomados entre los miles depositados cada año en las playas del Pacífico mexicano, tiene un mínimo efecto en el estado actual de la población.

La playa de Morro Ayuta tienen un valor biológico basado principalmente en que ahí se presenta un número de arribadas similar a las de La Escobilla, considerada la más importante a nivel nacional y la tercera a nivel mundial por el número de hembras de tortuga golfina que anualmente llegan a desovar (DOF, 2002). Esto nos habla de la responsabilidad de los científicos mexicanos ante la comunidad internacional para aportar conocimiento que eventualmente contribuya a la conservación de la tortuga golfina en el Pacífico mexicano.

El actual estudio aporta por primera vez, información valiosa sobre el periodo preciso en que ocurre la determinación sexual en las gónadas de embriones desarrollados en nidos de playa. Para lo cual, detectamos el efecto de la temperatura sobre la expresión de SOX9, como marcador de gónadas bipotenciales antes, durante y después de la diferenciación morfológica. Dichos datos ayudarán a explicar cómo especies con una historia evolutiva que data de más de 300 millones de años, han sobrevivido y adaptado a los numerosos cambios climáticos, geológicos y los recientes efectos antropogénicos que enfrentan las tortugas marinas.

## HIPÓTESIS

En nidos de playa, la regulación dimórfica de la expresión del gen SOX9 en los cordones medulares de la gónada, está directamente relacionada con la determinación sexual y la duración del periodo sensible a la temperatura de *Lepidochelys olivacea*.

## OBJETIVO GENERAL

Conocer la expresión de SOX9 durante la determinación sexual de las gónadas de embriones incubados en nidos de corral en la playa de Morro Ayuta.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Correlacionar en 10 nidos, la expresión de SOX9 con la morfología de la gónada, las etapas de desarrollo, la proporción de sexos y el promedio de temperatura durante el periodo sensible a la temperatura.

Validar estadísticamente el periodo en que ocurre la determinación sexual de la gónada, correlacionando la proporción de sexos y el perfil de temperatura en 39 nidos de la playa Morro Ayuta y cinco de La Escobilla, Oaxaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El área de estudio está comprendida por dos playas del estado de Oaxaca. La primera, el Santuario Playa de Escobilla, se localiza en el Municipio de Santa María Tonameca, Distrito de Pochutla. Las coordenadas que delimitan la zona playa son las siguientes: 15°43'43.73" N y 96°46'37.44" O y 15°40'47.45" N y 96°36'52.00" O. El Santuario está delimitado al norte por bienes comunales de San Francisco Cozoaltepec y bienes comunales de Santa María Tonameca, al sur por el Océano Pacífico, al este por el Río Tonameca y al oeste por el Río Cozoaltepec.

La segunda, la playa Morro Ayuta del municipio San Pedro Huamelula. La zona de trabajo se delimita a partir del Faro de Morro Ayuta al poniente del campamento en las coordenadas 15°51'16.13"N – 95°52'9.93"O y al oriente con punta Estrella, coordenadas 15°51'41.43"N y 95°50'15.58"O.

**MANEJO DE NIDOS EN CAMPO:** Realizando recorridos nocturnos cerca del campamento, se buscaron tortugas que estuvieran desovando y todos los huevos de los nidos encontrados, fueron contabilizados, colectados y transportados rápidamente en cuatrimotos para que el cambio brusco de temperatura no les afecte. Se reubicaron en un corral adjunto al campamento en la zona C de la playa. Formando hoyos de unos 30-40 cm de profundidad, semejando en lo posible el nido natural elaborado por una tortuga; colocamos primero la mitad de los huevos de la nidada original, el monitor de temperatura (HOBO Pendant<sup>®</sup> Temperature/Light 8K Data Logger) y después la segunda mitad de huevos, para asegurar que el monitor quede en medio del nido experimental. El registro de temperatura fue de cada 2 horas y para todos los experimentos el método de siembra fue el mismo.

**CALIBRACIÓN DE HOBOS:** Se promediaron los valores registrados cada dos horas para los 16 HOBOS. Se calcularon los valores máximos y mínimos, y la desviación estándar. No hubo diferencias significativas en los perfiles de las temperaturas. Por lo tanto, estos 16 HOBOS fueron utilizados para todos los experimentos. Figura 8. En este caso se graficaron los valores mínimos y

máximos en lugar de los valores de Desviación Estándar ya que en la gráfica no eran visibles.

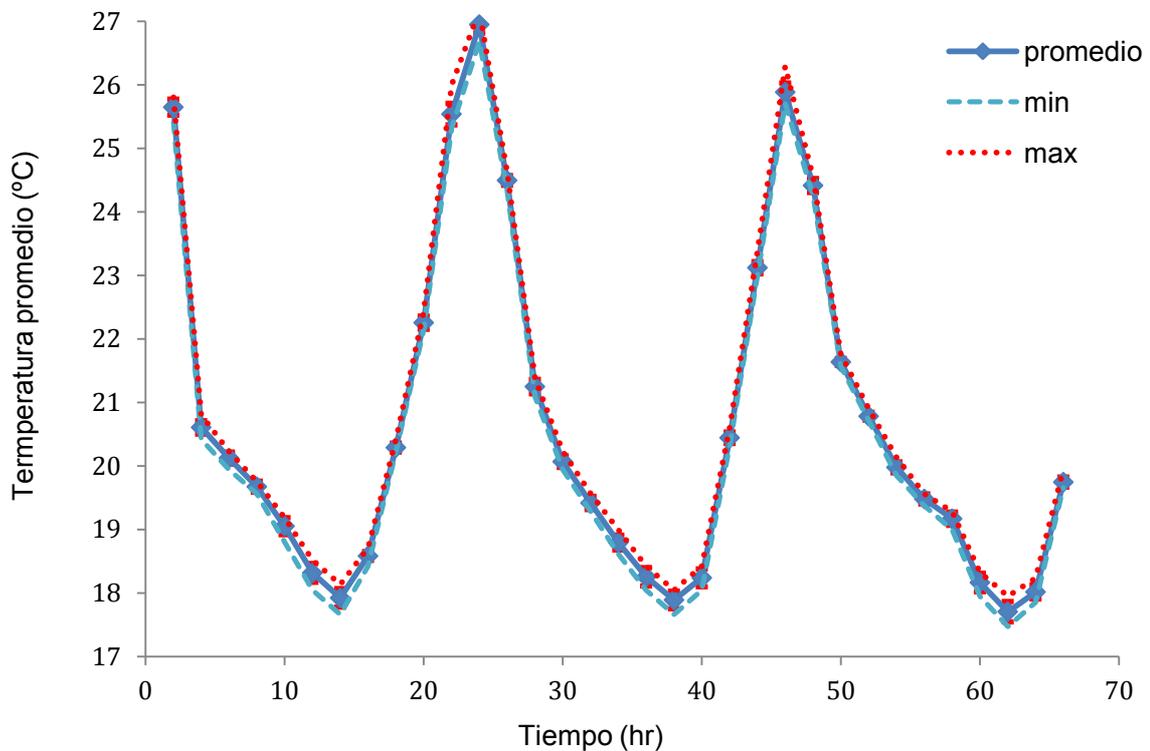


Figura 8. Calibración de los termómetros. Gráfico con promedios de las temperaturas registrado por los 16 HOBOS de manera simultánea. La variación entre ellos fue mínima.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

EXPERIMENTO 1: Para observar la expresión de SOX9 se tomaron muestras de diferentes nidos. A los 18 días se muestrearon entre 2-5 embriones de cada uno y se fijaron en PFA 4%, para observar SOX9 por inmunofluorescencia y un embrión Formalina para tener registro de la etapa en la que se encontraban. El mismo proceso se repitió a los 23 y 28 días. (ver PROCESAMIENTO DE MUESTRAS para más detalles). Se determinó como PTS al intervalo de tiempo en el cual la expresión de SOX9 se mantiene (en gónadas bipotenciales) y disminuye (en gónadas sexualmente determinadas como hembras). Una vez analizadas dichas muestras se correlacionaron con la etapa de desarrollo, la proporción sexual (obtenida al final del desarrollo) y el promedio de temperaturas en el PTS.

EXPERIMENTO 2: Para relacionar las proporciones sexuales con las temperaturas registradas en todos los nidos, seleccionamos de 15-20 embriones

en el centro del nido y se disecciona el complejo urogenital cercano a los 45 días de desarrollo o bien en etapas donde la gónada se encuentra morfológicamente diferenciada y se fijaron en solución de Bouin (ver PROCESAMIENTO DE MUESTRAS para más detalles). En este caso el sexo se determinó en 10-15 embriones de cada nido sembrado, según los criterios de Merchant-Larios (2000). La figura 9 muestra las fechas el momento en el que se muestrearon los nidos a lo largo de los 3 años del proyecto.

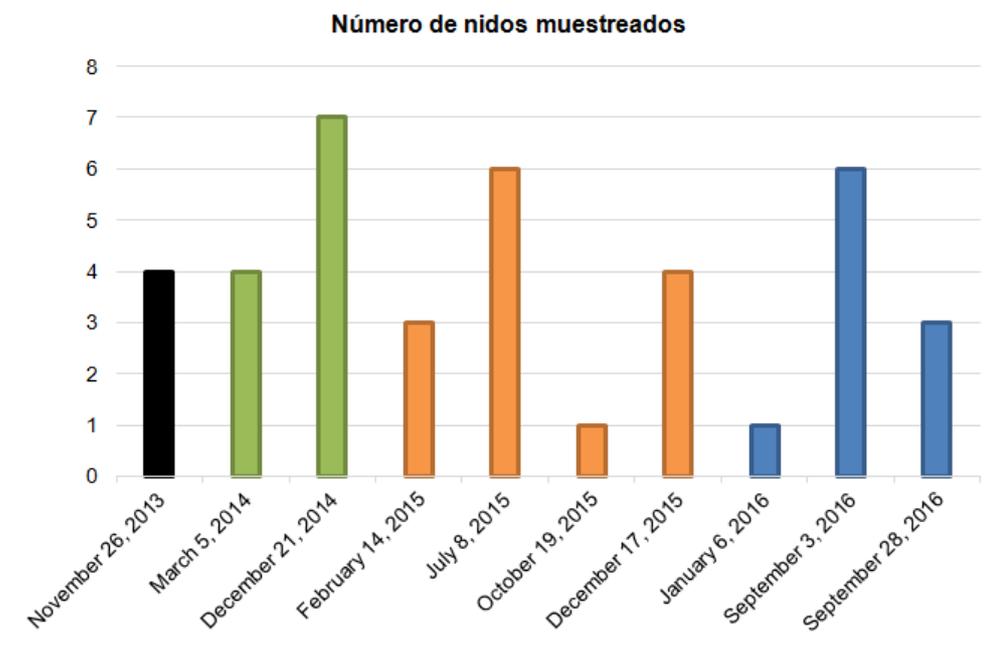


Figura 9. Gráfica de Barras con el número de nidos muestreados a lo largo de 3 años de trabajo en la playa Morro Ayuta y La Escobilla.

**PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:** Dado que la incubación de los nidos se realizó en condiciones naturales, fue necesario sacrificar las crías en playa para los análisis histológicos que se llevaron a cabo. Con base a los antecedentes publicados en la tesis de licenciatura (Hernández-Romero, A., 2015), se escogieron los días 18, 23 y 28 días de incubación. Muestrear cada 5 días y determinar si hay diferencias en el nivel de expresión de SOX9. Las gónadas aparecen como dos bandas claras que se extienden a lo largo de la longitud de los riñones (mesonefros). En todos los casos se extrae completo el complejo urogenital (gónadas y riñones) y posteriormente son procesadas en el laboratorio. Existen otros métodos de sexado como la observación directa de las gónadas in situ; o la técnica de aclaramiento de las gónadas in toto; (3) estudios histológicos

de las gónadas. Se concentran en los detalles morfológicos gonadales observados inmediatamente después de que las vísceras que las cubrían son removidas, o bien diferenciando entre testículo y ovario por su aspecto interno al transparentar el tejido; los testículos son distinguibles por una apariencia granular que posiblemente corresponde con la presencia de túbulos seminíferos (Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE 2000). Pese a la facilidad con la cual los procedimientos previos pueden ser realizados para determinar el sexo en crías, algunos autores han expresado seria preocupación por su validez, proponiendo que un criterio fiable sólo lo provee un estudio histológico de la gónada (Mrosovsky & Godfrey, 1995; Mrosovsky & Benabib, 1990).

**HISTOLOGÍA:** Las muestras fijadas en solución de Bouin. se enjuagaron en solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) y se deshidrataron con cambios de alcoholes en concentración creciente (70, 80, 90 100%), xilol y finalmente se incluyen en parafina. Posteriormente se sexaron los individuos con la obtención de cortes de 10-15 µm de grosor en un micrótopo para teñir con Hematoxilina-Eosina.

**INMUNOFLUORESCENCIA:** Las muestras fijadas en Paraformaldehído al 4% (PFA), se cambiaron a una solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) para ser procesadas en diferentes concentraciones de azúcar en PBS (10, 20 y 30%) y ser incluidas en "Tissue-Tek® O.C.T.<sup>TM</sup>" (mezcla de alcohol de polivinilo, polietilenglycol; marca Sakura, cat: 4583) utilizando cápsulas Beem. Se congelaron en Hexano y se mantuvieron a -70°C. Los cortes se obtuvieron en un criostato (Cryostat KEDEE KD-2850) a una temperatura de -20°C y con un grosor de 20 micras. Para remover lípidos las muestras fueron lavados con concentraciones crecientes de alcohol (25-100%). Para la exposición de las proteínas se trataron con una solución de citratos (pH 6) y se mantuvieron en baño María a 92°C por 45 minutos para exponer los epítopes del antígeno. De esta manera el antígeno (la proteína SOX9) quedó expuesto nuevamente. Las muestras se lavaron en PBS para posteriormente permeabilizar con Tritón 0.5% por 20 minutos y permitir el paso de los anticuerpos al núcleo, ya que SOX9 es un factor de transcripción. Se bloqueó con suero de caballo al 10%, 2% de albúmina y 0.5% Tritón. Los cortes se expusieron al anticuerpo primario conejo anti-SOX9 toda la noche a 4°C, diluido en PBS 1x pH 7.4 (1:600). (El anticuerpo fue

preparado y purificado en el laboratorio inmunizando conejos de bioterio a partir de la secuencia SOX9 C-terminal VPSIP-Q-THSPQ-HWEQ-PVYTQLTRP) de acuerdo con el protocolo descrito por Diaz *et al.* (2012) y Morais da Silva *et al.* (1996). Al siguiente día se lavaron con PBS y se expuso al anticuerpo secundario, Alexa Fluor® 555 cabra anti-IgG de conejo (Life Technologies) diluido 1:200 en PBS 1x pH 7.4. Se bloqueó nuevamente con suero de caballo al 10%, 2% de albúmina y 0.5% Tritón durante 1 hora. Las muestras se incubaron toda la noche con anticuerpo primario ratón anti-citoqueratina (AE1/AE3 + 8/18) (Biocare Medical) diluido en Verde DaVinci (1:100). Este anticuerpo nos ayuda a diferenciar células epiteliales del resto de las células ya que las queratinas son filamentos intermedios del citoesqueleto típicos de dichas células. Al siguiente día se lavaron con PBS 1x y se expusieron al anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 donkey anti-IgG de ratón (Molecular Probes, Invitrogen). Para marcar núcleos de todas las células las muestras fueron teñidas con TOTO-3 iodide (Molecular Probes, Invitrogen). Las imágenes fueron tomadas y procesadas con un microscopio confocal Zeiss Pascal LSM5.

Para relacionar las proporciones sexuales con las temperaturas observadas se realizó un análisis estadístico con el programa SAS 9.0.

## RESULTADOS

Para identificar el periodo del desarrollo embrionario en que se determina el sexo a nivel de la gónada, correlacionamos los resultados de los tres parámetros estudiados. A saber: La expresión de SOX9 según la etapa de desarrollo y el perfil de temperatura en 10 nidos. Además, en 39 nidos se correlacionó el perfil de temperatura con la proporción de sexos.

### LA EXPRESIÓN DE SOX9 SEGÚN LA ETAPA DE DESARROLLO

Las células epiteliales de los cordones medulares y del epitelio superficial se pueden distinguir por la presencia de citoqueratina, filamento intermedio que forma parte del citoesqueleto, ausente en el tejido estromático de la gónada.

#### Muestras de 18 días:

En el caso de los embriones muestreados a los 18 días (etapa 24), encontramos que las gónadas estaban en la etapa bipotencial, caracterizada por la expresión de la proteína SOX9 en la gran mayoría de los núcleos de las células epiteliales que forman los cordones medulares. Tanto las gónadas muestreadas en diciembre de 2015, como las de septiembre de 2016, presentaron las mismas características (Figs 10, 11).

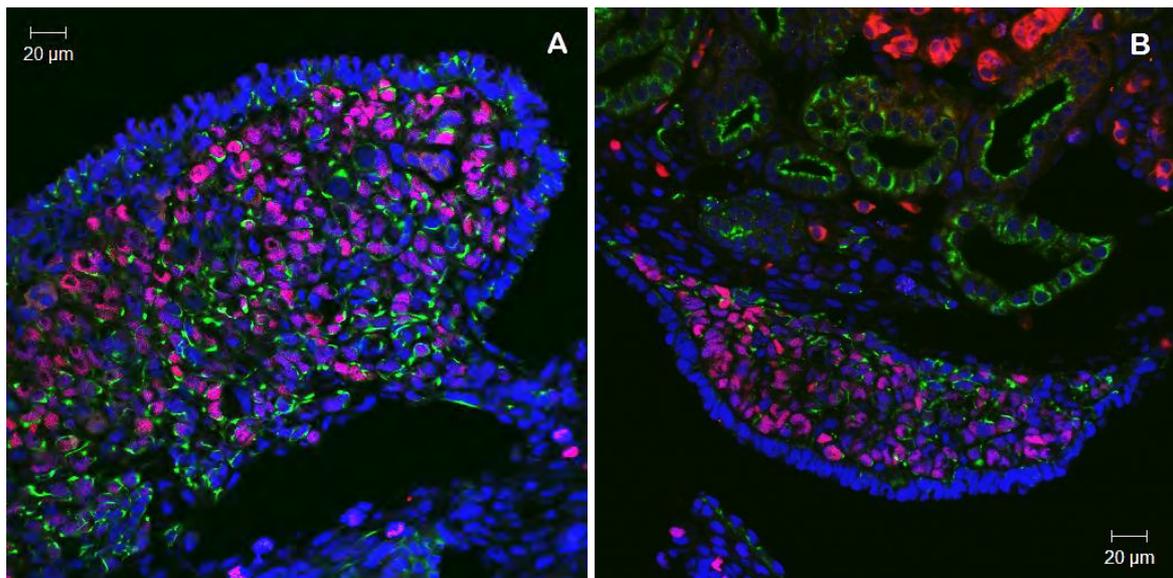


Figura 10. Inmunofluorescencia de gónadas bipotenciales del Lote 5 Nido 4 (diciembre 2015) muestreados a los 18 días, etapa 24. Los núcleos de los cordones medulares son positivos a la expresión de SOX9 (rojo), en tanto que las células del epitelio superficial

son negativos. Las células epiteliales de la gónada (G) y el mesonefros (M) están marcadas con citoqueratina (verde). Los núcleos de la gran mayoría de las células (epiteliales y estromáticas) están teñidos con TOTO-3 (azul).

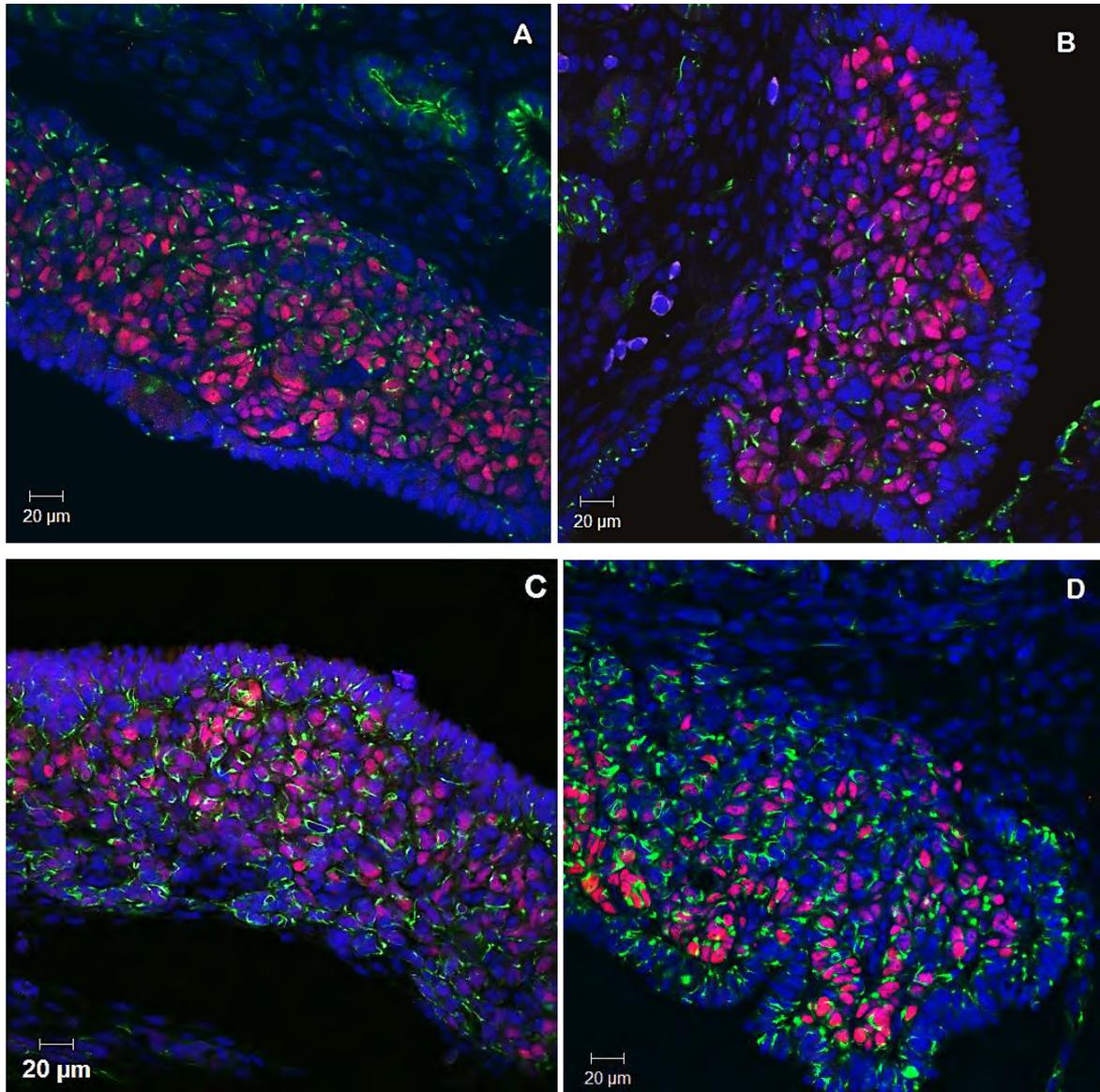


Figura 11. Inmunofluorescencia de gónadas bipotenciales del Lote 7 (septiembre 2016) muestreados a los 18 días, etapa 24. Cordones medulares con la mayoría de núcleos positivos a la expresión de SOX9 (rojo). Células epiteliales marcadas con citoqueratina en corteza y médula (verde) y núcleos de todas las células teñidos con TOTO-3. Imagen A: nido 1; imagen B: nido 2; imagen C: nido 3; imagen D: nido 4.

#### Muestras de 23 días:

Las gónadas de los embriones muestreados a los 23 días (etapa 25), presentaron proporciones diferentes en el número de células de los cordones medulares con

SOX9+. Algunas gónadas aun mostraban la mayoría de sus células positivas a SOX9, en proporción similar a las de la etapa 24. Al tratarse de gónadas morfológicamente indiferenciadas, se clasificaron como “testículos potenciales”. Esto lo observamos tanto en los nidos muestreados en diciembre de 2015 como en septiembre 2016 (Figs. 11 y 12). Por otra parte, en otros embriones el número de células con núcleos SOX9+ en sus cordones disminuyó ostensiblemente. Encontramos gónadas donde tan solo había algunas células negativas a SOX9, mientras que, en otras el número de estas células era mayor. De manera que en contraste con las gónadas cuyos cordones cuyas células mantienen la expresión de SOX9 similar a las de la etapa 24 (18 días), los embriones muestreados en etapa 25(23 días) mostraron una evidente disminución en la proporción de células SOX9+, fueron consideradas como “ovarios potenciales”. (Figs.13 y 14).

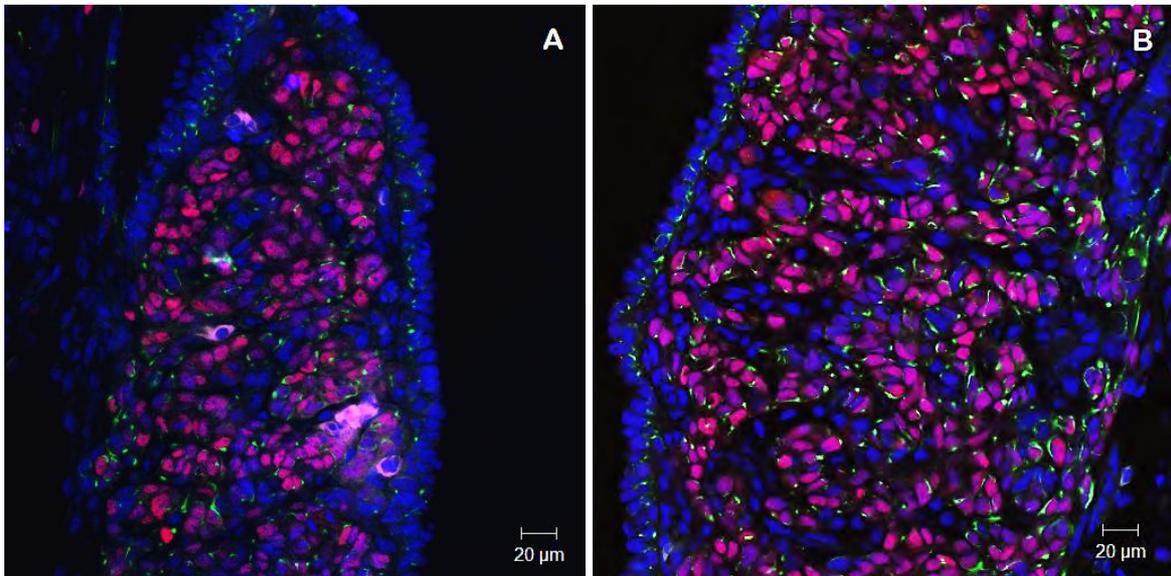


Figura 12. Inmunofluorescencia de “testículos potenciales” del Lote 5 Nido 4 (diciembre 2015) muestreados a los 23 días (etapa 25). Cordones medulares positivos a la expresión de SOX9 (rojo), células epiteliales marcadas con Citoqueratina en corteza y médula (verde) y núcleos de todas las células teñidos con TOTO-3. Imagen A, embrión a; imagen B, embrión b.

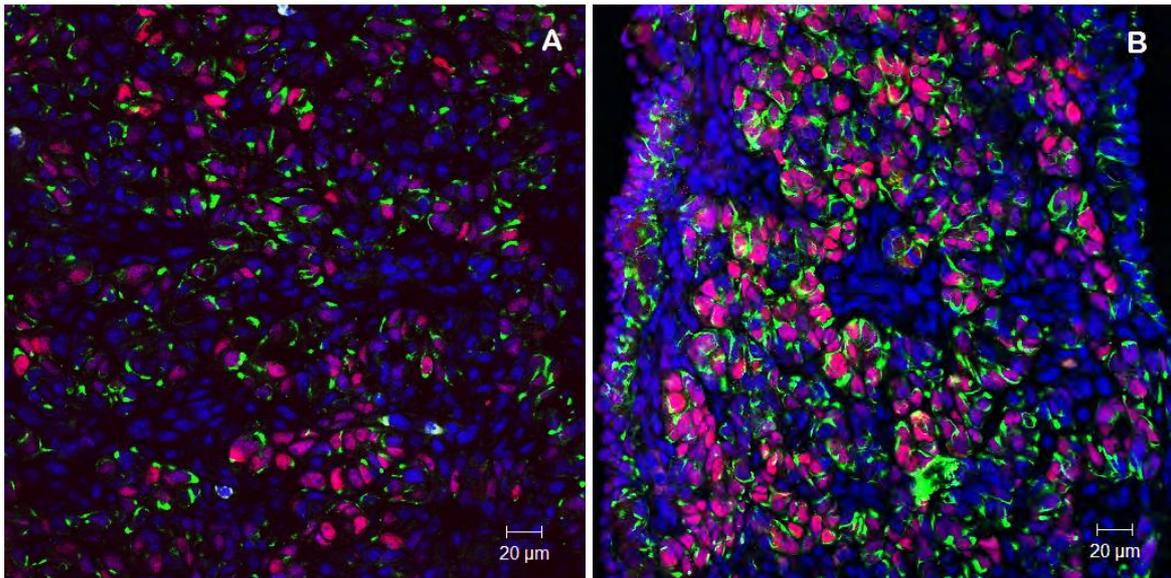


Figura 13. Inmunofluorescencia de “testículos potenciales” del Lote 7, Nido 1 (diciembre 2015) muestreados a los 23 días (etapa 25). Cordones medulares positivos a la expresión de SOX9 (rojo), células epiteliales marcadas con citoqueratina en corteza y médula (verde) y núcleos de todas las células teñidos con TOTO-3. Imagen A: embrión a; imagen B: embrión b

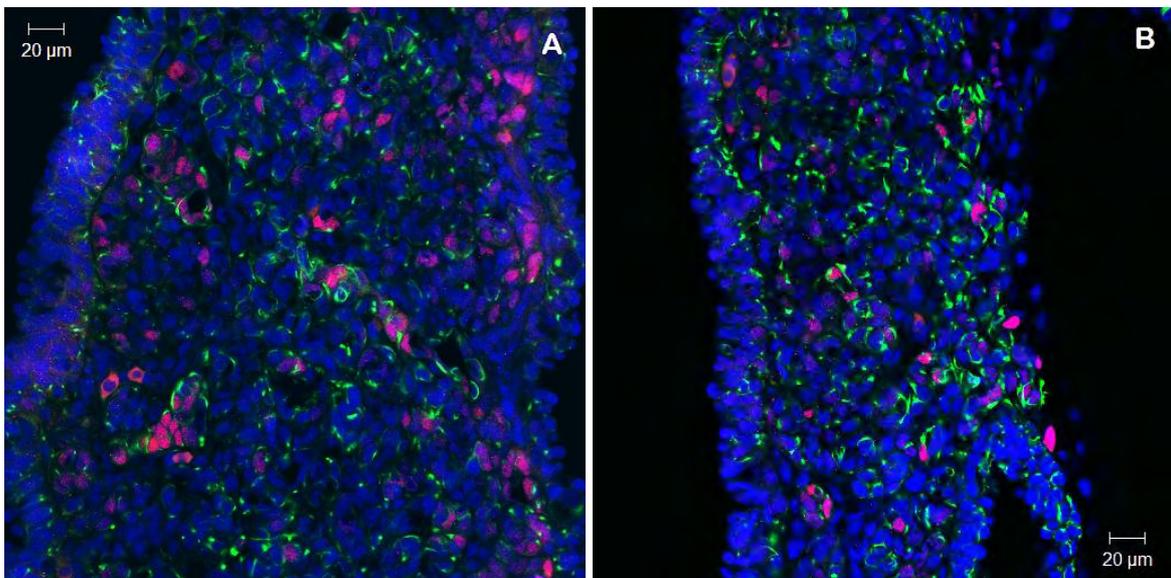


Figura 14. Inmunofluorescencia de “ovarios potenciales” del Lote 5, Nido 1 (Diciembre 2015) muestreados a los 23 días (etapa 25). Algunas células de cordones medulares positivas a la expresión de SOX9 (rojo) y otras negativas aunque mantienen la marca positiva para citoqueratina (verde) y TOTO-3 (azul). Imagen A: embrión a; imagen B: embrión b.

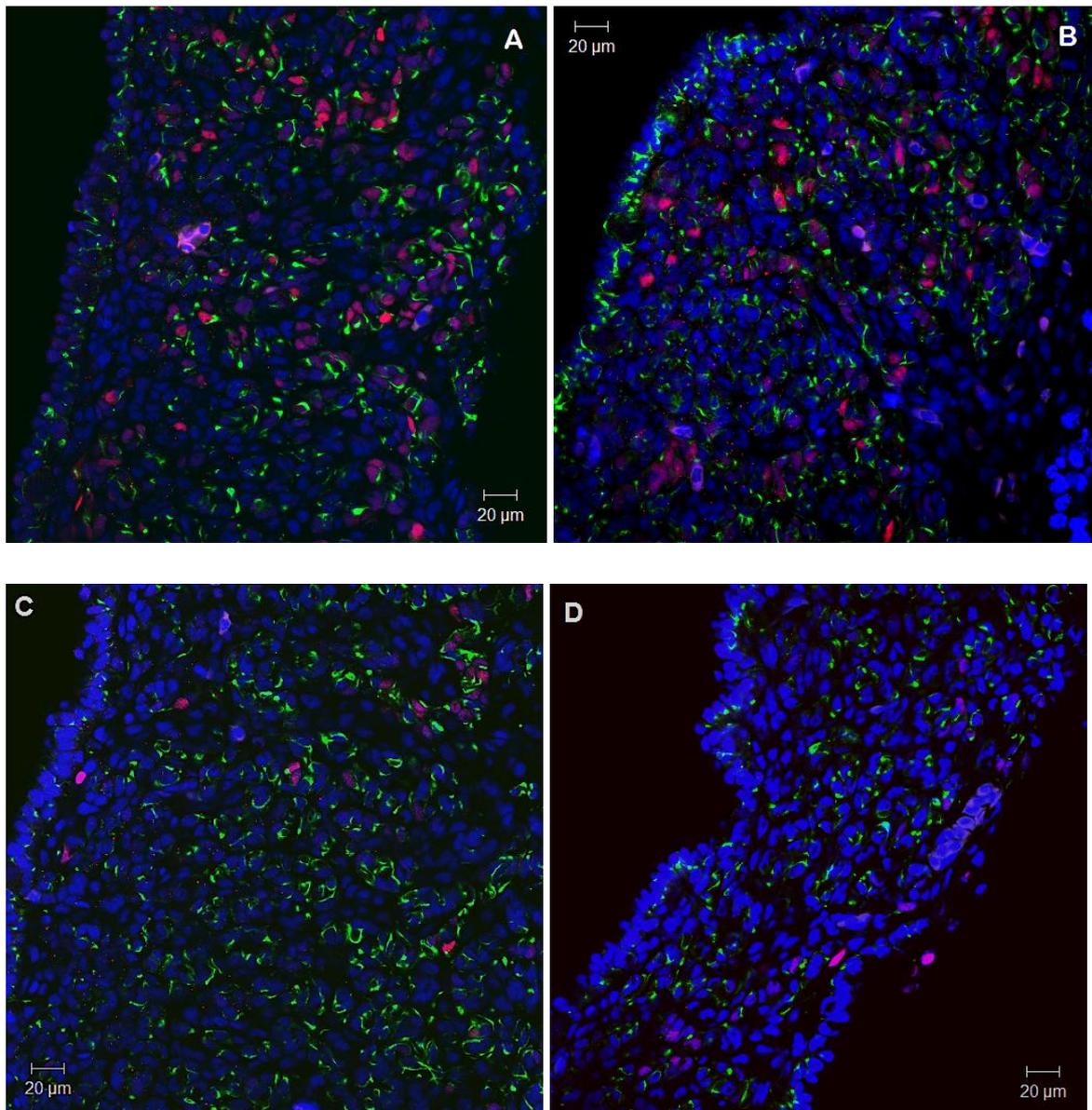


Figura 15. Inmunofluorescencia de “ovarios potenciales” del Lote 7 (septiembre 2016) muestreados a los 23 días (etapa 25). Algunas células de cordones medulares positivas a la expresión de SOX9 (rojo) y otras negativas, aunque mantienen la marca positiva para citoqueratina (verde) y TOTO-3 (azul). Imagen A: nido 1; imagen B: nido 2; imagen C: nido 3; imagen D: nido 4.

#### Muestras de 28 días:

Al analizar los embriones muestreados a los 28 días (etapa 26) fue muy clara la diferencia entre ovarios y testículos. Los ovarios ya mostraban una corteza engrosada formada por un epitelio pseudoestratificado y en la zona medular quedaba no más de 5 células positivas a SOX9 o menos. Así mismo, la mayoría de los cordones medulares ya se encontraban disgregados. En el caso de los embriones diferenciados como machos, todos los cordones medulares están

formados por células epiteliales SOX9+, en tanto que las del epitelio superficial permanecen SOX9-. (Figs. 15 y 16).

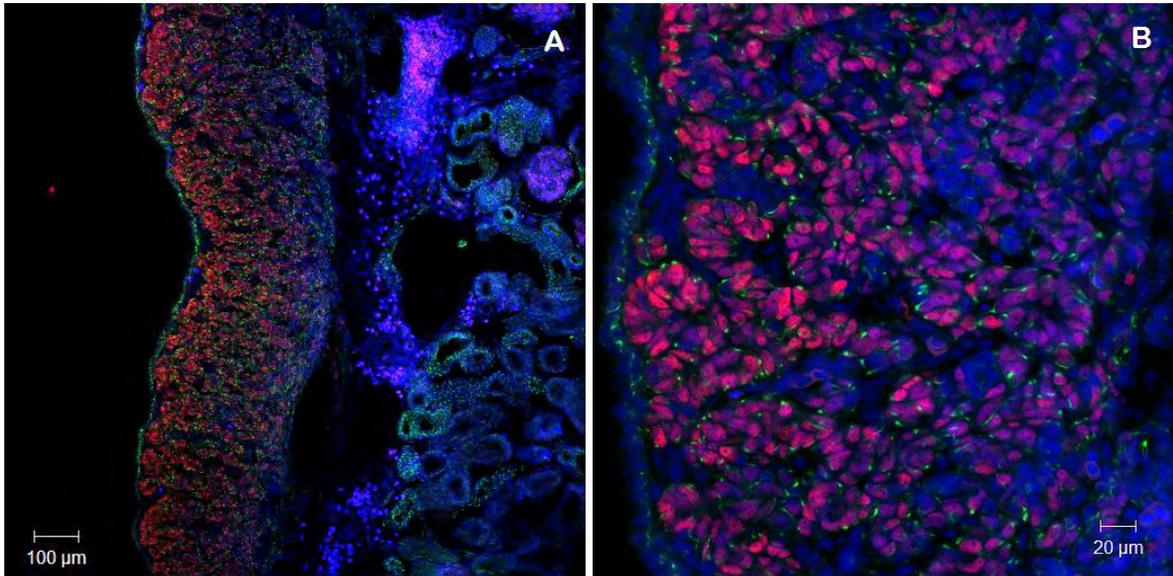
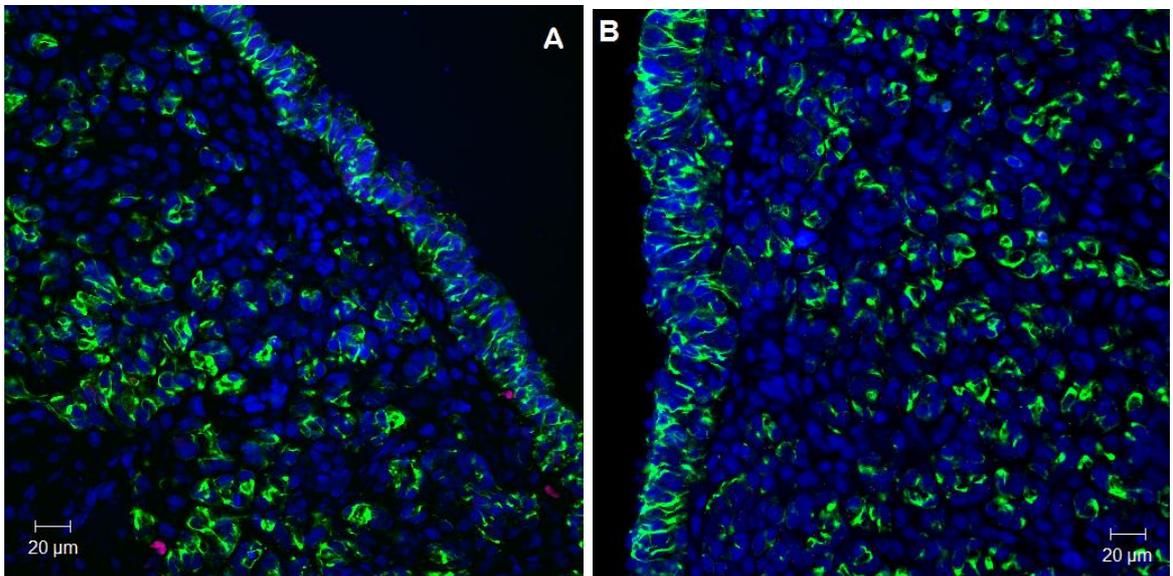


Figura 16. Inmunofluorescencia de testículos del Lote 5 (diciembre 2015), muestreados a los 28 días (etapa 25). Todos los núcleos de los cordones medulares mantienen la expresión de SOX9 (rojo), la marca positiva para citoqueratina (verde) y TOTO-3 (azul).



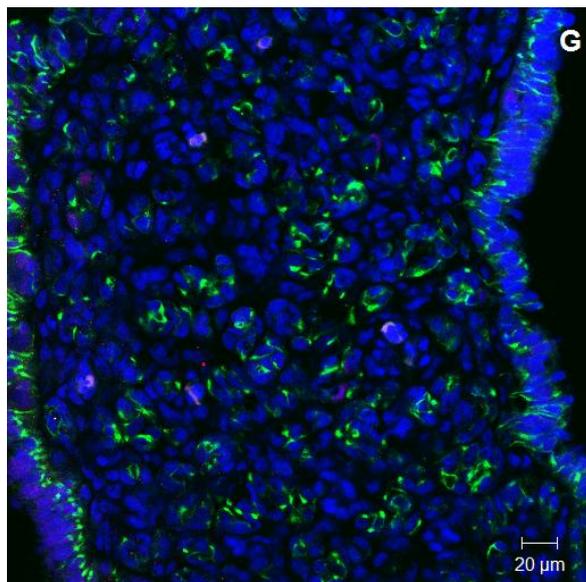
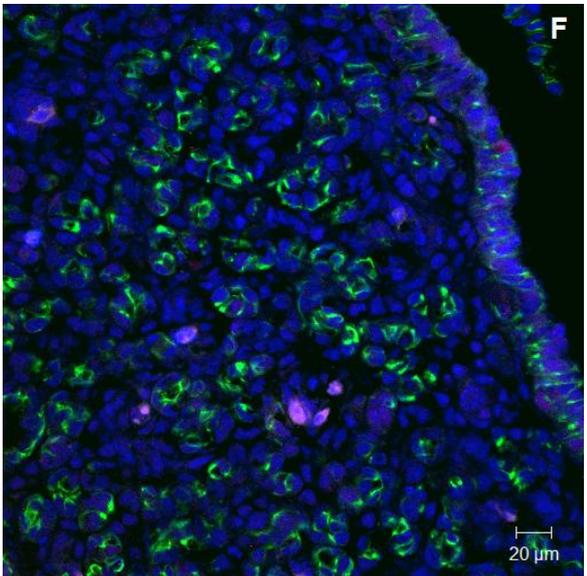
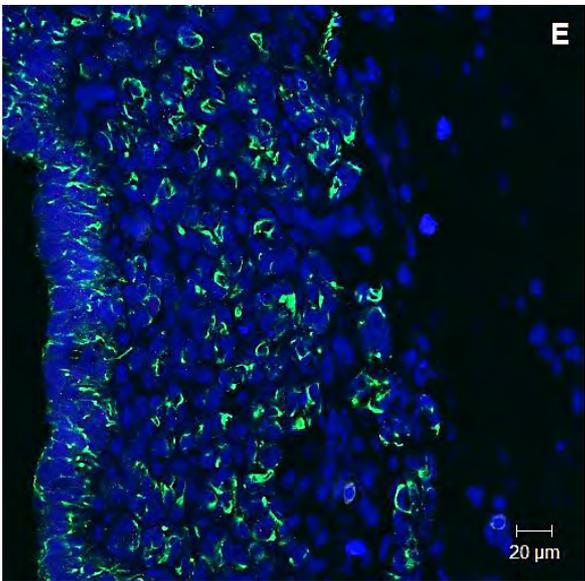
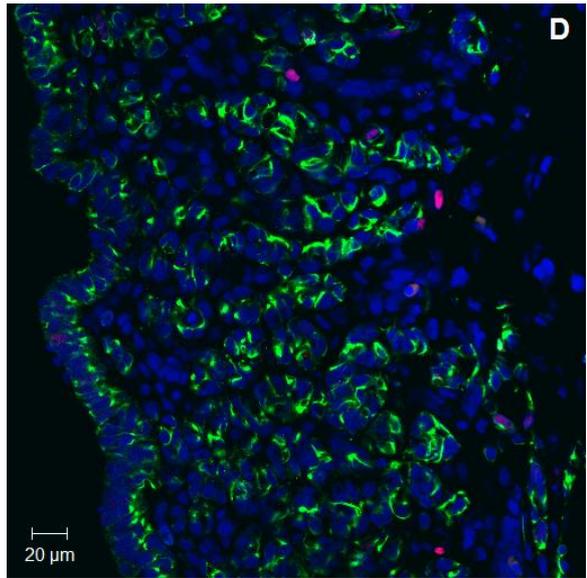
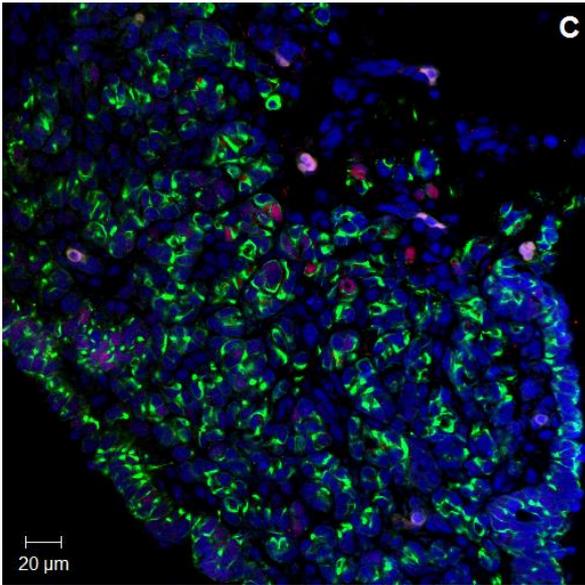


Figura 17. Inmunofluorescencia de ovarios del Lote 5 (diciembre 2015) y Lote 7 (septiembre 2016), muestreados a los 28 días (etapa 25). Todos los núcleos de los cordones medulares mantienen la expresión de SOX9 (rojo), la marca positiva para citoqueratina (verde) y TOTO-3 (azul). Imagen A: Lote 5. Imágenes B, C, D y E, F y G: Lote 7

El análisis por inmunofluorescencia de las gónadas embrionarias nos permitió correlacionar la variación de la expresión de SOX9 en las gónadas de etapas tempranas (24-26), con la proporción de ovarios y testículos diferenciados, correspondientes a dos lotes de la playa Morro Ayuta (PML5 y PML7).

En la etapa 24 (n=32), casi todas las células de los cordones medulares mostraron la expresión de SOX9 en los 10 nidos muestreados (4 nidos en PML5 y 6 nidos en PML7). En cambio, en la etapa 25 encontramos claras diferencias entre nidos del mismo lote y entre los dos lotes estudiados. En el lote 5 (PML5), los dos embriones muestreados del nido 1, no mostraron la expresión de SOX9 y los embriones de los nidos 2, 3 y 4, permanecieron positivos. En contraste, los embriones del lote 7, mostraron en el nido 1, sólo dos embriones con cordones medulares positivos a SOX9 y tres fueron negativos. Todas las gónadas de los otros cinco nidos (N2-N6) fueron negativas. Finalmente, los embriones del lote 5 muestreados en la etapa 26, tuvieron un solo embrión negativo en el nido 1 y el resto permaneció positivo. En tanto que SOX9 fue negativo en las gónadas de todos los embriones (n=38) de los seis nidos del lote 7. La correlación de la expresión de SOX9 con la proporción de sexos en cada nido, resulta interesante. Es evidente que en los nidos del lote 5 la proporción de machos coincide con el mantenimiento de la expresión de SOX9 en las etapas 25 y 26. Además, hay una clara correlación entre el apagado del gen en esas mismas etapas y el porcentaje de hembras detectadas por la diferenciación de ovarios. El resumen de dichos resultados se encuentra en la tabla 2.

Tabla 2. Detección de SOX9 durante tres etapas del desarrollo y proporción de sexos en etapas cercanas a la eclosión. En cada nido se analizó la expresión de SOX9 en 2 a 5 embriones por etapa.

NIDO	PML5				PML7					
	N1	N2	N3	N4	N1	N2	N3	N4	N5	N6
Etapa 24	++	++	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Etapa 25	--	++	++	++	++---	-----	-----	-----	-----	-----
Etapa 26	+-	++	++	++	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Proporción sexual	63%M 36%H	75%M 25%H	91.6M 8.4%H	75%M 25%H	20%M 80%H	0%M 100%H	0%M 100%H	0%M 100%H	0%M 100%H	0%M 100%H

(+) y (-): Gónadas con expresión positiva o negativa de SOX9, respectivamente. Cada símbolo (+ ó -) se refiere a un embrión analizado.

Podemos observar que para el día 23 de incubación los embriones con ovarios potenciales ya se encuentran en etapas 25/26, donde SOX9 comienza a disminuir su nivel de expresión, es decir, en etapas tempranas de la diferenciación sexual. Esto es evidente tanto en el número de células positivas a SOX9 y en la intensidad de la marca en cada una de ellas. Tanto los embriones muestreados en diciembre 2015 como los muestreados en septiembre de 2016 muestran este patrón. Por lo tanto, los resultados sugieren que en los lotes 5 y 7 de Morro Ayuta, los embriones ya están determinados en la etapa 25.

## PERFILES DE TEMPERTURA DE LOS NIDOS CUYA EXPRESIÓN DE SOX9 FUE ANALIZADA

Morro Ayuta: El primer muestreo se realizó en diciembre de 2015 en el cual se incubaron 4 nidos. La figura 17 muestra el gráfico de temperaturas registradas en esas fechas y los días de muestreo. El segundo muestreo se realizó en septiembre del 2015, en este caso se incubaron 6 nidos (figura 18). Para los dos muestreos esperamos al día 38 para muestrear 10 embriones de cada nido y sexar las gónadas con histología. Los embriones muestreados a los 38 días se encontraban en etapa 28 y las gónadas claramente diferenciadas. Al mismo tiempo se colectaron los Hobos para descargar las temperaturas de cada nido, dejando al resto de los embriones continuar su desarrollo hasta la eclosión y liberar las crías.



Figura 18. Gráfico con promedio de temperaturas registradas diariamente, desde el día 1 al día 38 del desarrollo. Las flechas negras verticales, indican los días en los que se diseccionaron las gónadas para detectar la expresión de SOX9 en tres etapas, así: **18 días: etapa 24, 23 días: etapa 25, 28 días: etapa 25-26 y 38 días: etapa 29-30.**

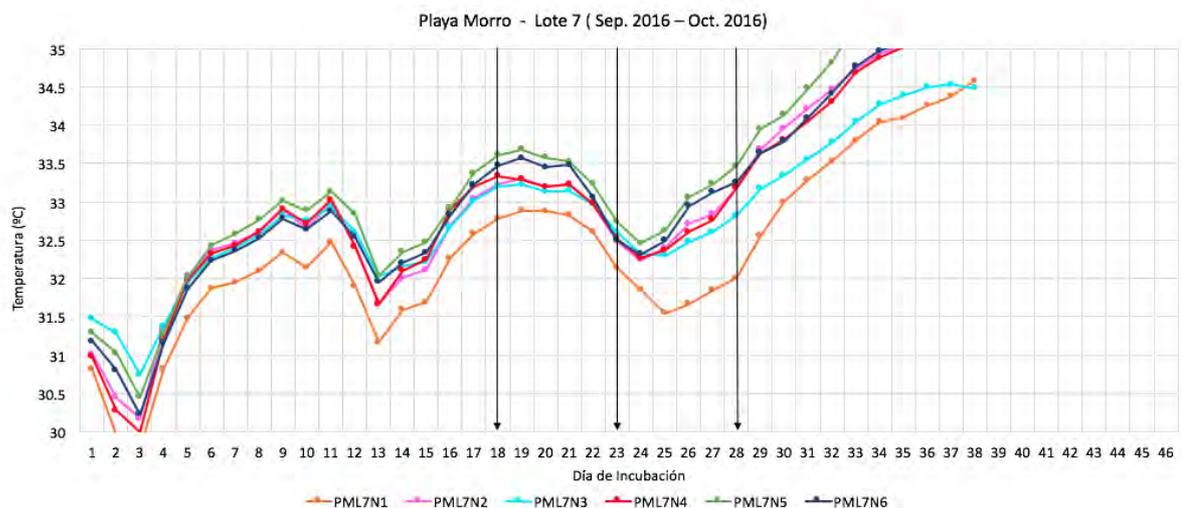


Figura 19. Promedio de temperaturas diarias registradas desde el día 1 al día 38 de desarrollo. Las flechas negras verticales indican los días en los que se diseccionaron las gónadas para observar la expresión de SOX9. **18 días, etapa 24; 23 días: etapa 25; 28 días: etapas 25-26 y 38 días: etapas 29-30.**

Es importante resaltar que en los dos muestreos (Lote 5 y Lote 7), el total de los nidos presentaron las mismas etapas de desarrollo a los 18, 23 y 28 días. A pesar de que las temperaturas no son iguales en cada caso. Figura 20 y 21.

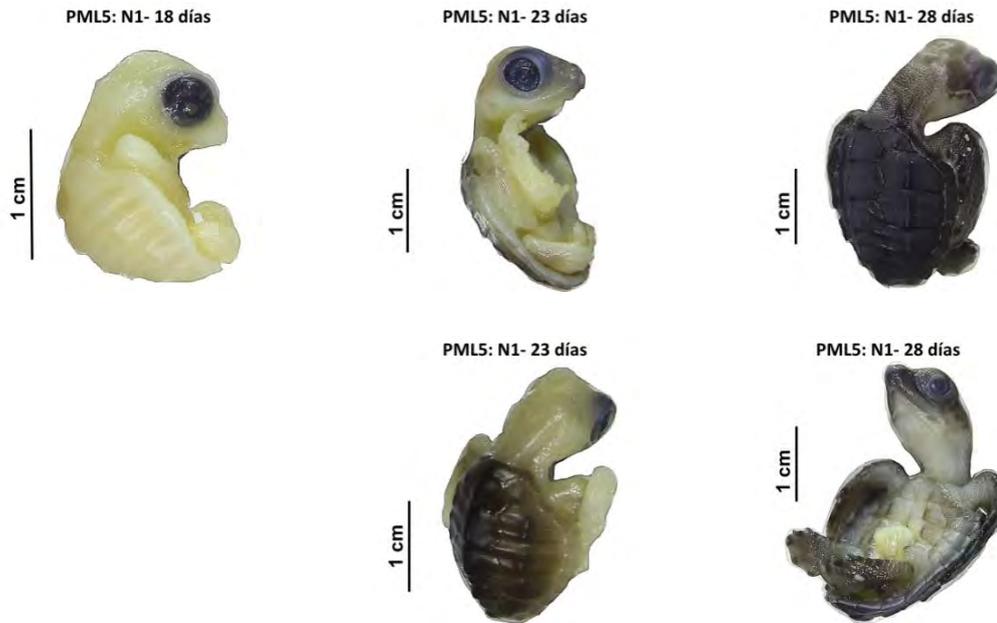


Figura 20. Etapas de desarrollo de los embriones de *L. olivacea* obtenidas de nidos incubados en playa correspondientes al muestreo PML5. 18; 23 y 28 días: etapas 24, 25 y 25-26 respectivamente. Se consideran las características para tortugas marinas propuesto por Miller (1985), en el cual *L. olivacea* fue omitida.

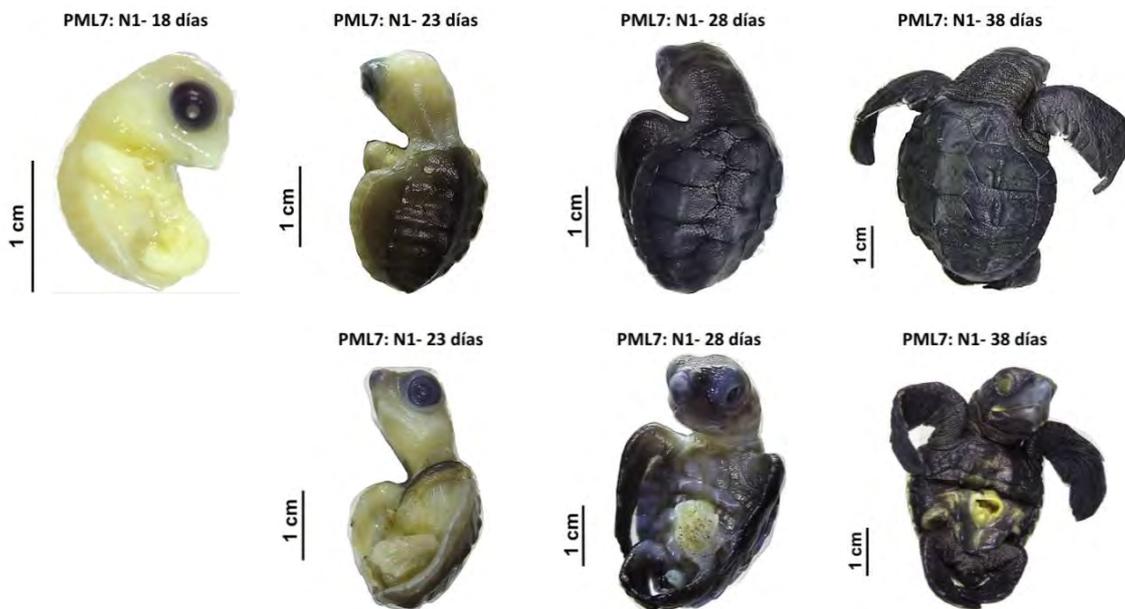


Figura 21. Etapas de desarrollo de los embriones de *L. olivacea* obtenidas de nidos incubados en playa correspondientes al muestreo PML7. 18; 23, 28 y 38 días: etapas 24, 25, 25-26 y 29-30 respectivamente. Se consideran las características para tortugas marinas propuesto por Miller (1985), en el cual *L. olivacea* fue omitida.

## PERFILES DE TEMPERATURA Y PROPORCIÓN DE SEXOS EN EL TOTAL DE NIDOS ESTUDIADOS

La información para las playas Morro Ayuta y La Escobilla está dividida en Lotes, cada uno de los cuales corresponde a fechas diferentes. En la playa Morro Ayuta se realizaron muestreos desde noviembre 2013 hasta enero 2014 donde obtuvimos un total de 39 nidos muestreados y en playa La Escobilla desde julio 2013 a enero 2016 donde obtuvimos un total de 4 nidos muestreados (Tabla 3). Nomenclatura: En el texto nos referimos a cada Lote según la playa en que fue colectado, así: PM: Playa Morro Ayuta; PE: Playa Escobilla; L1: Lote 1 y N1: Nido 1. Ejemplo: PML1N1 (playa Morro Ayuta, lote 1, nido 1).

Tabla 3. Fechas de lotes en playa Morro Ayuta y La Escobilla. **Los datos en negritas corresponden a los nidos muestreados para detectar la expresión de SOX9.**

Playa	Lote	No. de Nidos	Fecha Siembra	Fecha Colecta
Morro Ayuta	A	4	26/nov/13	04/ene/14
Morro Ayuta	B	4	05/mar/14	24/abr/14
Morro Ayuta	1	7	21/dic/14	04/feb/15
Morro Ayuta	2	3	14/feb/15	26/mar/15
Morro Ayuta	3	6	08/jul/15	21/ago/15
Morro Ayuta	4	1	19/oct/15	08/dic/15
<b>Morro Ayuta</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>17/dic/15</b>	<b>24/ene/16</b>
Morro Ayuta	6	1	06/ene/16	26/feb/16
<b>Morro Ayuta</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>03/sep/16</b>	<b>11/oct/16</b>
Morro Ayuta	8	3	28/sep/16	06/nov/16
La Escobilla	0	3	17/jul/13	09/ago/13
La Escobilla	1	1	18/ene/15	12/feb/15
La Escobilla	5	1	24/dic/15	28/ene/16

De cada nido se muestrearon alrededor del 20% de embriones, los cuales fueron sexados con técnicas histológicas. Para cada nido obtuvimos los porcentajes correspondientes de hembras y machos (el porcentaje restante) para cada nido (Tabla 4)

Tabla 4. Nidos de Playa Morro Ayuta: Proporciones sexuales y promedios de temperatura. **Los datos en negritas corresponden a los nidos muestreados para detectar la expresión de SOX9.**

Playa/Lote/Nido	Total de huevos	% Hembras
PMLAN1	p.100	-
PMLAN3	p.100	-
PMLAN5	p.100	62
PMLAN6	p.100	25
PMLBN2	105	100
PMLBN4	67	100
PMLBN5	107	100
PMLBN6	75	100
PML1N1	99	-
PML1N2	80	-
PML1N3	73	-
PML1N4	80	-
PML1N5	75	-
PML1N6	93	5
PML1N7	126	-
PML2N9	119	33.33
PML2N11	90	64
PML2N12	123	100
PML3N1	p.100	100
PML3N2	p.100	100
PML3N3	p.100	100

Playa/Lote/Nido	Total de huevos	% Hembras
PML3N4	p.100	100
PML3N5	p.100	100
PML3N6	p.100	100
PML4N1	120	100
<b>PML5N1</b>	<b>109</b>	<b>36</b>
<b>PML5N2</b>	<b>93</b>	<b>25</b>
<b>PML5N3</b>	<b>106</b>	<b>8.4</b>
<b>PML5N4</b>	<b>75</b>	<b>25</b>
PML6N1	140	-
<b>PML7N1</b>	<b>86</b>	<b>80</b>
<b>PML7N2</b>	<b>117</b>	<b>100</b>
<b>PML7N3</b>	<b>103</b>	<b>100</b>
<b>PML7N4</b>	<b>86</b>	<b>100</b>
<b>PML7N5</b>	<b>112</b>	<b>100</b>
<b>PML7N6</b>	<b>67</b>	<b>100</b>
PML8N1	89	100
PML8N2	71	100
PML8N3	91	100
PEL0N14	102	100
PEL0N15	109	100
PEL1N3	105	83.3
PEL5N2	75	100

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de temperaturas se seleccionaron los datos de temperaturas de los días 12 al 28 ya que antes del día 12 las temperaturas no influyen sobre la determinación sexual y a partir de día 28 ya están en etapas avanzadas de diferenciación. De esta manera se puede ejemplificar el perfil de temperatura para cada nido y el rango de temperaturas que nos interesa (del día 17-23) se encuentra dentro del mismo. También podemos ver que los nidos dentro de un lote no son medidas independientes, pues las condiciones de temperatura son muy parecidas, por lo que estadísticamente, lo correcto es trabajar con los promedios por lote. Figura 19.

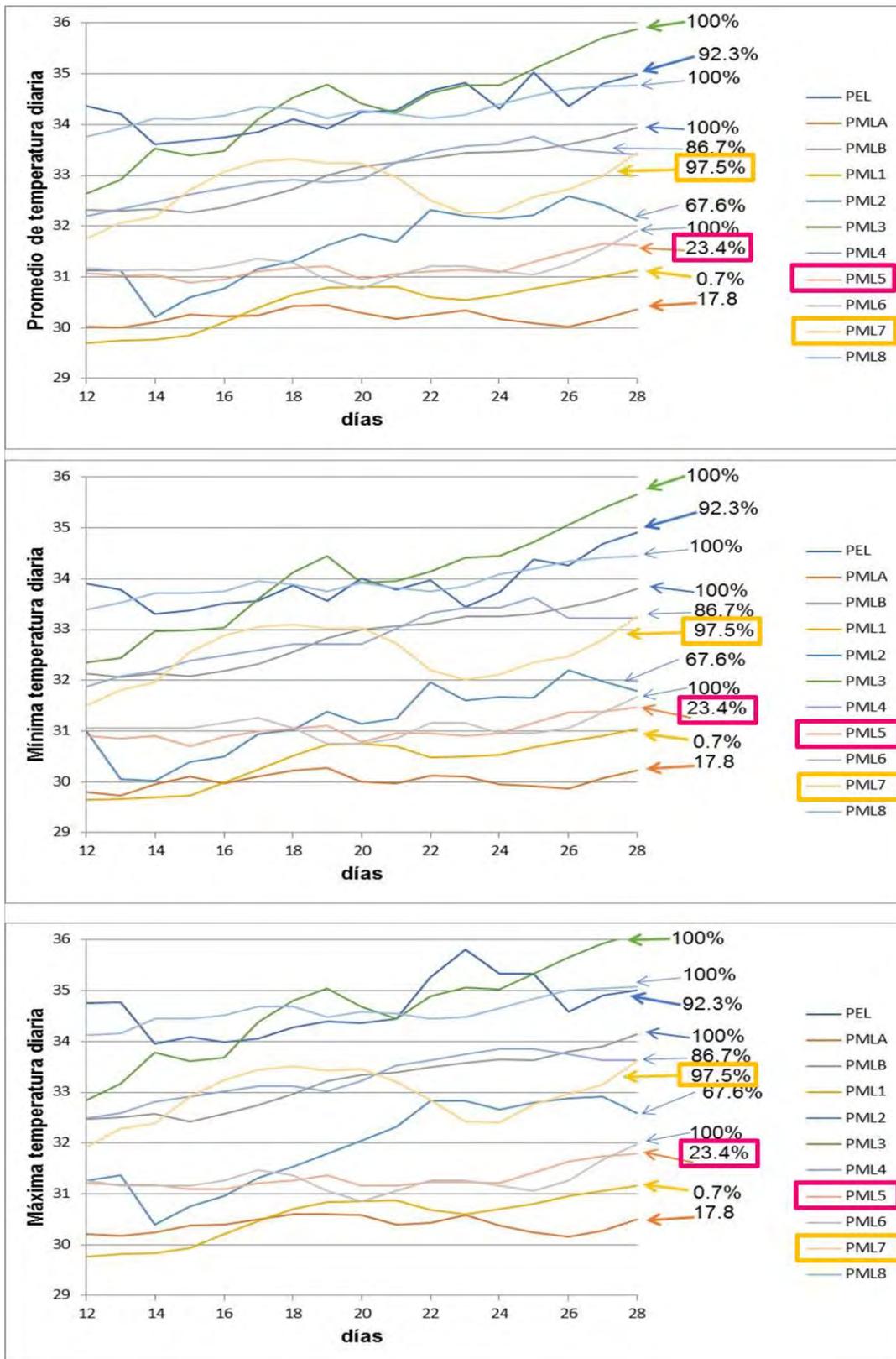


Figura 22. Gráficas de las temperaturas promedio, mínimas y máximas diarias por lote, anotando el porcentaje de hembras en cada lote. **Los datos en cuadros corresponden a los nidos muestreados para detectar la expresión de SOX9**

Al analizar los perfiles de temperatura y las proporciones sexuales en las gráficas anteriores notamos que las temperaturas se pueden analizar de diferentes maneras: los valores promedio, mínimos o máximos por día, y buscar si existe alguna diferencia significativa de dichos valores vs las proporciones sexuales observadas. Tanto en los perfiles completos de temperatura como en las gráficas de promedios, mínimos y máximos; notamos que existen dos nidos que no parecen guardar una relación del 100% con el resto de los datos: PMLAN3 y PML6N1 ya que en el análisis de regresión lineal se encuentran fuera del intervalo de confianza. Estos datos pueden ser datos atípicos o bien algún error de muestreo. Por tal razón se eliminaron de los análisis estadísticos para observar si con o sin ellos había una diferencia significativa en los resultados (Figura 20). El análisis de regresión no lineal muestra que estos dos nidos se encuentran fuera del intervalo de confianza. Figura 21 y 22. Dicho análisis se realizó con el paquete estadístico SAS 9.0

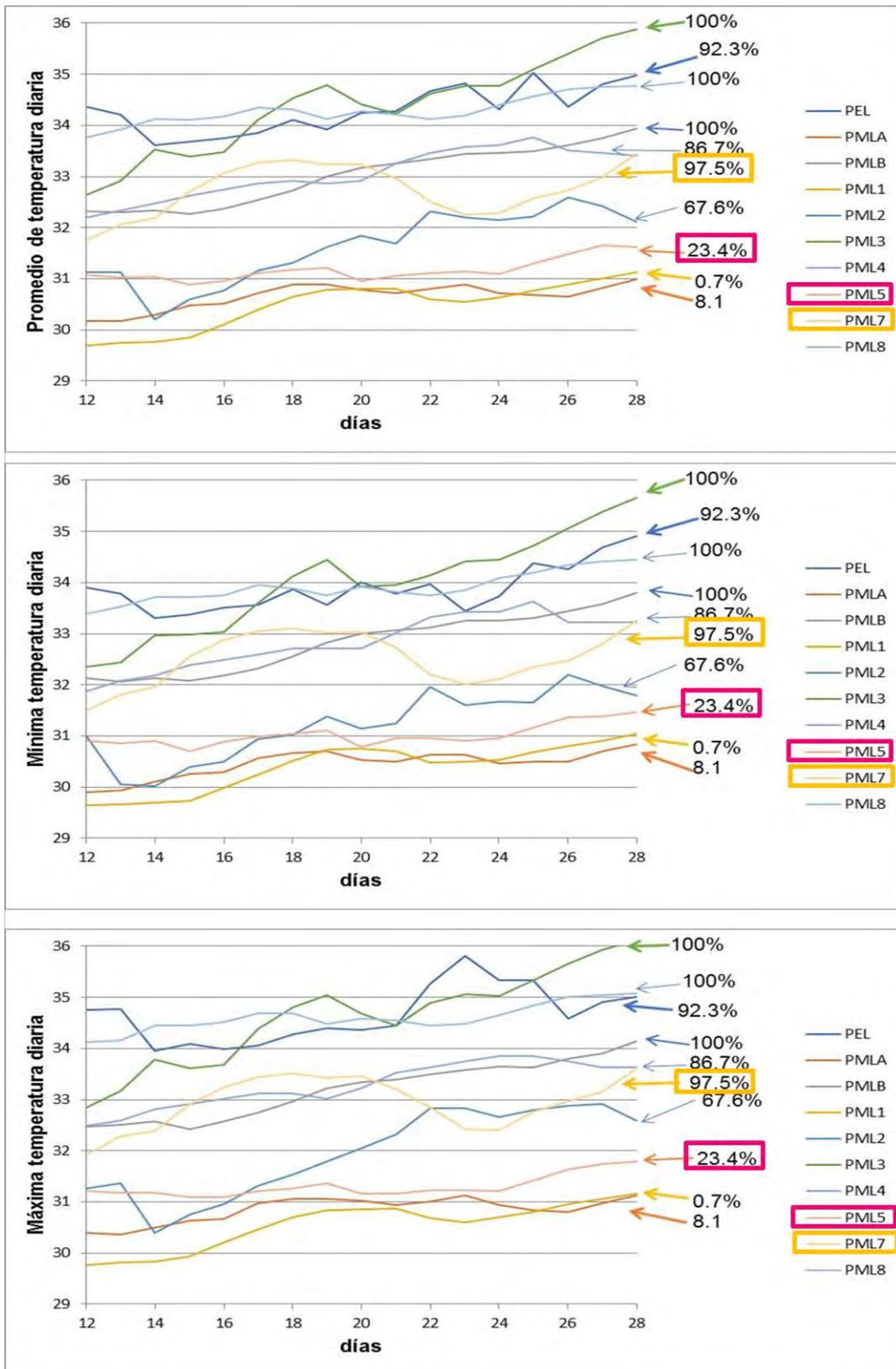


Figura 23. Gráficas de las temperaturas promedio, mínimas y máximas diarias por lote, anotando el porcentaje de hembras en cada lote. (eliminando los datos de PMLAN3 y PML6N1). Los datos en cuadros corresponden a los nidos muestreados para detectar la expresión de SOX9

Con las gráficas mostradas en las figuras 19 y 20, es evidente que el aumento de temperatura mantiene una relación directa con la proporción de hembras observada en cada nido.

Para correlacionar los promedios observados (del día 17-23) y las proporciones sexuales en cada nido, se hizo un **análisis de Regresión Lógica de 2 parámetros**. El primer análisis se realizó con todos los nidos analizados incluidos PMLAN3 y PML6N1 con los promedios, mínimos y máximos registrados por día de incubación (Fig. 21)

Tabla 5. Temperaturas promedio, mínimos y máximos durante los días 17-23 de incubación en los 11 lotes analizados

		Promedio	DS	Mínimo	Máximo	% Hembras
<b>Lote</b>	PE	34.3	0.55	33.4	35.8	92.3
	PMLA	30.3	0.17	30	30.6	17.8
	PMLB	33.1	0.33	32.3	33.6	100.0
	PML1	30.7	0.16	30.2	30.9	0.7
	PML2	31.7	0.48	30.9	32.8	67.6
	PML3	34.5	0.32	33.6	35.1	100.0
	PML4	33.1	0.32	32.6	33.7	86.7
	PML5	31.1	0.12	30.8	31.4	23.4
	PML6	31.1	0.21	30.8	31.5	100.0
	PML7	33.0	0.43	32	33.5	97.5
	PML8	34.2	0.27	33.7	34.7	100.0

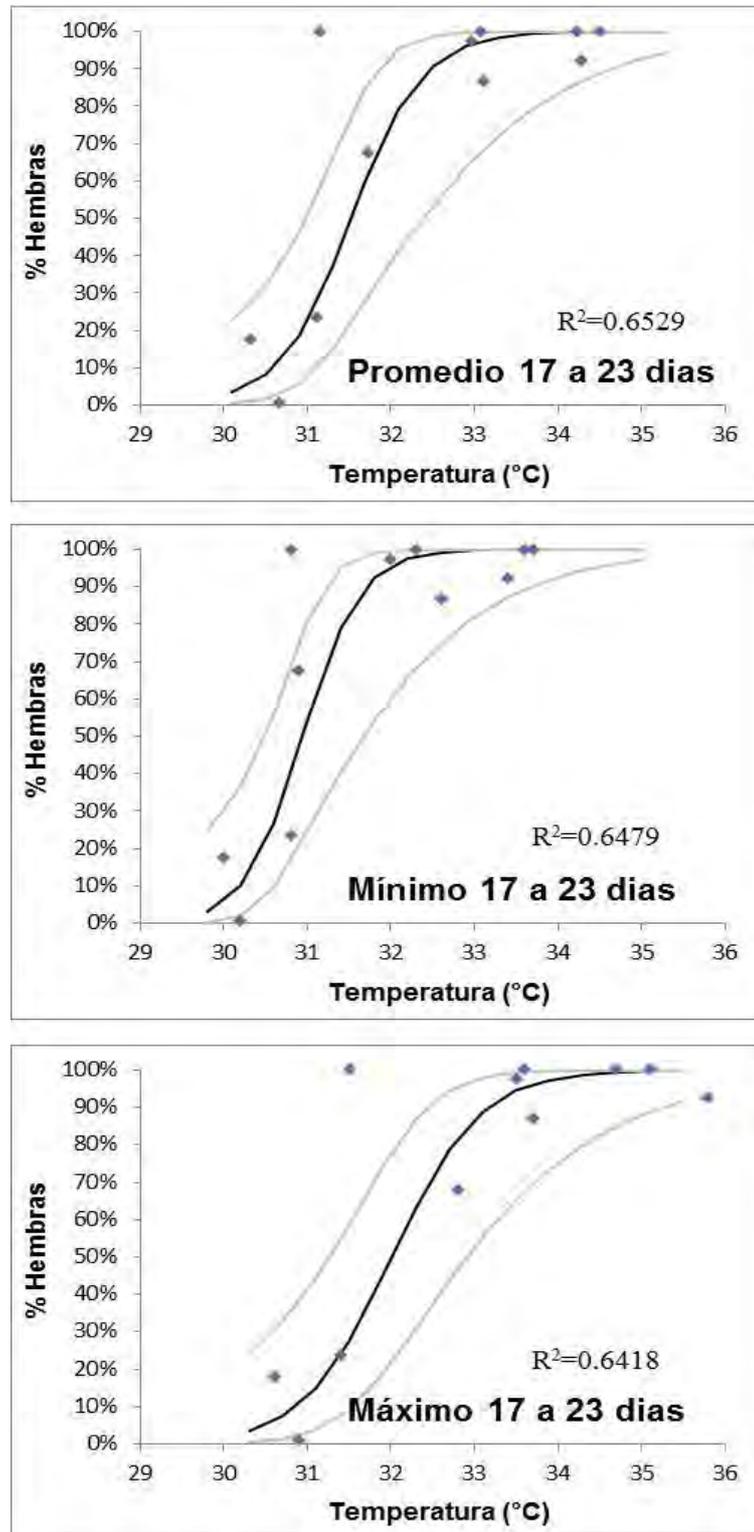


Figura 24. Regresión Logística entre proporciones sexuales y promedio de temperaturas de 43 nidos sembrados en la playa Morro Ayuta y La Escobilla. La línea negra es la curva obtenida con la regresión logística, las líneas grises son intervalos de 95% confianza.

Se repitió el mismo análisis pero eliminando los nidos PMLAN3 y PML6N1 ya que se encontraban fuera del intervalo de confianza y podría tratarse de un error de muestreo o de técnica en el manejo de los equipos. Al eliminar dichos nidos en

los 3 casos (promedios, mínimos y máximos) el valor de  $R^2$  aumenta 0.1 y el intervalo de confianza disminuye notablemente (Figura 22).

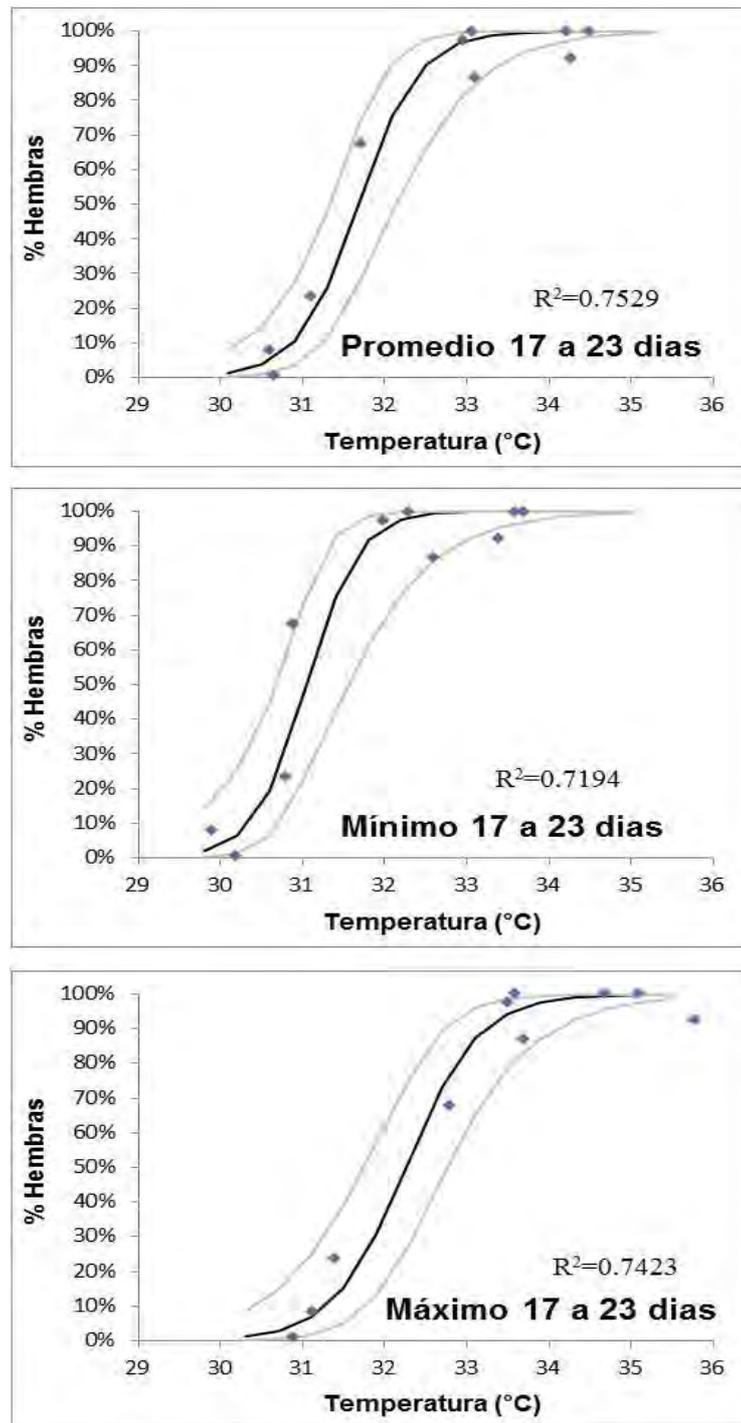


Figura 25. Regresión Logística entre proporciones sexuales y promedio de temperaturas de 41 nidos sembrados (eliminando PMLAN3 y PML6N1) en la playa Morro Ayuta. La línea negra es la curva obtenida con la regresión logística, las líneas grises son intervalos de 95% confianza.

En los dos análisis de Regresión no lineal que se observan en las figuras 21 y 22, no observamos diferencia significativa entre los valores obtenidos usando promedios, mínimos o máximos de temperatura registrado por día de incubación.

### TEMPERATURA PIVOTE (TP)

Con base al análisis anterior, utilizando todos los registros de temperatura (cada dos horas) e intersectando la curva para buscar una temperatura pivote que nos de una proporción de 1:1 es de **31.5°C**. Quitando PMLAN3 y PML6N1, la temperatura pivote es de **31.7°C**. Dichos valores son los más altos reportados hasta la fecha para una población de *L. olivacea* o cualquier otra especie de tortugas marinas. A partir de los parámetros de la regresión logística, se calculó la TP y el valor de TRT.

### RANGO DE TEMPERATURA DE TRANSICIÓN (TRT, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS: TRANSITIONAL RANGE OF TEMPERATURE)

El intervalo de temperaturas o el Rango de Temperatura de Transición (TRT, por su traducción directa del inglés) representa las condiciones térmicas en las que esperaríamos encontrar nidos con ambos sexos. A temperatura por debajo o arriba de estas temperaturas se esperaría que los nidos formarían 100% machos ó 100% hembras, respectivamente.

Dicho intervalo se calculó a partir de temperaturas promedio y temperaturas máximas diarias. Los intervalos varían de entre 3.4°C (temperaturas promedio) y 4.1°C (temperaturas máximas). La probabilidad para cada intervalo se calculó a partir de los parámetros de la regresión logística.

<b>PROMEDIO</b> de temperaturas	La temperatura a la cual existe una probabilidad de <b>0.01</b> de que un embrión sea hembra:	<b>30.0°C</b>
	La temperatura a la cual existe una probabilidad de <b>0.99</b> de que un embrión sea hembra:	<b>33.4°C</b>

TRT: 30.0 – 33.4°C

Valores <b>MÁXIMOS</b> de temperatura	La temperatura a la cual existe una probabilidad de <b>0.01</b> de que un embrión sea hembra:	<b>30.2°C</b>
	La temperatura a la cual existe una probabilidad de <b>0.99</b> de que un embrión sea hembra:	<b>34.3°C</b>

TRT: 30.2 – 34.3°C

# DISCUSIÓN

## EXPRESIÓN DE SOX9

Contamos con una pequeña base de datos que se recopiló a partir de agosto 2013 para el trabajo de mi tesis de licenciatura. A pesar de ser pequeña, fue el preámbulo para continuar y modificar algunos aspectos de la colecta y obtener un mayor muestreo de las dos playas durante los años siguientes. Los primeros muestreos en las playas de Morro Ayuta y La Escobilla se realizaron solamente durante los días 18 y 32.

La regulación de la expresión dimórfica de SOX9 en los cordones medulares se relaciona con el desarrollo de ovarios o testículos, es negativa en los primeros y positiva en los segundos (Merchant-Larios & Díaz-Hernández, 2012). Sin embargo, antes de que ocurra la diferenciación morfológica, los cordones medulares son SOX9 positivos en la gónada bipotencial a las dos temperaturas; esto se constató en los embriones desarrollados en condiciones naturales analizados en diciembre del 2013.

Observamos que, a los 18 días de desarrollo las gónadas se encuentran en un periodo indiferenciado y bipotencial. Presentan una marca positiva para SOX9 en los núcleos de las células de los cordones medulares. Los embriones indiferenciados se encontraban en las etapas 23-24 lo que coincide con lo reportado en embriones incubados en el laboratorio empleando la técnica de RT-PCR (Torres-Maldonado et al., 2002). Los embriones colectados en playa a los 32 días ya se encontraban en etapas avanzadas de la diferenciación gonadal. Sin embargo, observamos algunos ovarios con núcleos positivos a SOX9. Como la diferencia de células positivas y negativas a SOX9 entre ovarios y testículos fue variable, consideramos que se trataba de una etapa de transición diferente a lo observado en huevos incubados 32 días en el laboratorio (etapa 26-27).

Los muestreos realizados en diciembre de 2015 (PML5) y septiembre de 2016 (PML7), el día 18 las gónadas se encontraban en la etapa indiferenciada y los embriones en la Etapa 23/24. En este caso todos los núcleos de las células que forman los cordones medulares eran positivos a la expresión de SOX9. Esto coincide con lo observado en laboratorio, donde se registró la expresión de SOX9

tanto a temperatura masculinizante (26°C) y feminizante (33°C) (Moreno-Mendoza et al., 2001).

A los 23 días notamos que la expresión de SOX9 en las células de los cordones se presentaba en dos modalidades, gónadas SOX9 positivas y gónadas SOX9 negativas. La cantidad de células con núcleos SOX9 negativos era muy contrastante al comparar con las gónadas de individuos con núcleos SOX9 positivos. Por tal razón decidimos asumir que los embriones cuyas gónadas mantuvieron un número de células SOX9 positivas similar a las del día 18 eran testículos potenciales. En cambio, las gónadas con una clara disminución en el número de ellas habían iniciado la determinación hacia ovarios. **Por lo tanto, consideramos que en los actuales nidos muestreados el día 23 (etapa 24-25), la determinación sexual de las gónadas ya se ha iniciado.** Estos resultados coinciden con los experimentos de intercambio donde a partir de la etapa 25, sólo algunos embriones responden al intercambio de temperatura (Merchant-Larios, Díaz-Hernández, & Marmolejo-Valencia 2010). **En estos casos la expresión de SOX9 nos ayudó a distinguir si las gónadas eran testículos potenciales u ovarios potenciales, donde SOX9 comienza a disminuir su nivel de expresión de manera gradual.** Gracias a la percepción que nos dan los cortes longitudinales pudimos notar que en los ovarios comienza a disminuir la expresión de SOX9 en la parte central de la gónada que se encuentra adjunta al mesonefros y al mismo tiempo en los extremos de la gónada la expresión de SOX9 es mayor.

A los 28 días de desarrollo (etapas 26-27) se encontraron gónadas con cordones medulares SOX9 positivos y negativos notándose una gran diversidad individual en cuanto al grado de diferenciación de las gónadas. Si relacionamos estos datos, con lo propuesto por Wibbels et al. (1991) donde menciona que los embriones de un nido (incubado natural o artificialmente) aparentemente son determinados a diferentes tiempos en un proceso todo o nada (Wibbels, Bull, & Crews, 1991) se puede pensar que los embriones responden a las temperaturas del nido pero no todos al mismo tiempo. Aunado a esto se asume que durante los primeros dos tercios del desarrollo las temperaturas de un nido en la parte superior, media e inferior son muy similares (variación de 0.4-0.5°C) y en el tercer tercio de la incubación después del día 30 cuando ya se determinó el sexo de los embriones, la variación de temperatura entre los 3 niveles puede variar 1°C en promedio (Booth &

Astill, 2001). Si en los nidos de *L. olivacea* se presentara esta situación, sería necesario evaluar las proporciones sexuales en los 3 niveles del nido. Para este estudio se muestrearon los huevos al centro de cada nido, adjunto al HOBO para minimizar lo mejor posible esta posible variación en el muestreo. Al haber fluctuaciones de la temperatura en playa es posible que algunos embriones de *L. olivacea* se determinen al alcanzar la etapa 23, otros en la etapa 24 e incluso algunos todavía lo hagan en la etapa 25. Como la regulación dimórfica de la expresión de SOX9 fue ya evidente el día 23 en un nido donde todos están bajo la misma temperatura, corresponde a una ventana de tiempo del desarrollo de la gónada, en la cual los embriones responden de manera individual, durante el periodo sensible a la temperatura. En el caso de los 10 nidos donde observamos la expresión de SOX9, independientemente de las posibles variaciones de temperatura intranido, observamos las mismas etapas en todos los embriones analizados.

Todas estas observaciones nos indican que en *L. olivacea* la expresión dimórfica del gen Sox9, puede emplearse como marcador para estudiar el efecto de la temperatura durante la diferenciación sexual de la gónada bipotencial tanto en laboratorio como en condiciones naturales.

Se ha reportado que en los nidos de las playas La Escobilla y Morro Ayuta el periodo desde la puesta hasta la eclosión es de alrededor de 45-55 días (Márquez et al., 1982), el cual es similar a la de los embriones incubados en el laboratorio a 33°C constantes (Merchant-Larios et al., 2010). Sin embargo; encontramos que en los nidos de playa la tasa de crecimiento de los embriones para pasar de una etapa a otra, durante el primer tercio y el inicio del segundo, difiere con la del laboratorio. Recordando que tanto en el Lote 5 y Lote 7 encontramos las mismas etapas a los mismos días a pesar de haber registrado temperaturas diferentes.

En el laboratorio se estableció como el periodo sensible a la temperatura (PST) al periodo comprendido entre las etapas 23 y 26, ya que es cuando ocurre el proceso de "Determinación Sexual" a nivel de la gónada morfológicamente indiferenciada (Merchant-Larios et al., 1997). El establecimiento de la cresta genital ocurre en la etapa 22 y su diferenciación morfológica como ovario o testículo es evidente en la etapa 26. Estas etapas se ubican entre el final del primer y al inicio del segundo

tercio de la incubación. De manera que, a nivel de la gónada embrionaria, la temperatura influye sobre la determinación sexual en función de la velocidad del crecimiento inicial del embrión. Es decir, la temperatura del primer y segundo tercio determinarán el número de días en el que los embriones alcanzan la etapa 22 durante el primer tercio de la incubación.

Aunque se asume que un efecto similar al establecido en el laboratorio ocurra en condiciones naturales, hasta ahora los estudios realizados en playa están basados en correlaciones y no existen estudios examinando directamente el desarrollo de las gónadas. En el presente trabajo el análisis de la proporción de sexos y la temperatura se realizó promediando entre los días 17/18 y 23. Decidimos usar estos días ya que al observar las etapas de desarrollo en playa son cercanas a las observadas a 33°C en el laboratorio. Asumimos que a los 17/18 días los embriones se encontrarían al inicio de la etapa 24 (como se observa a 33°C) y que después, el día 23, las muestras colectadas en playa en etapa 25, mostrarían los primeros signos de determinación sexual en términos de la expresión de SOX9. Este intervalo de tiempo es de alrededor de 7 días coincide con el propuesto por Merchant-Larios et al. (1997, 2010) y López-Correa et al. (2010), quienes también realizaron experimentos con *L. olivacea* donde utilizaron temperaturas controladas de 26-33°C y 28-32°C. Los promedios registrados para los 45 nidos en playa se encuentran dentro de dichos rangos o incluso toleraron temperaturas mayores a los 34°C.

Algunos estudios en otras especies de tortugas marinas encuentran que la duración del periodo sensible a la temperatura oscila entre los 8 y 10 días, según la duración total de incubación (López-Correa et al., 2010; Merchant-Larios, 1997; Merchant-Larios et al., 2010; Yntema & Mrosovsky, 1982). Con estos antecedentes y nuestros actuales resultados con la expresión de SOX9 en embriones desarrollados en playa, es evidente que el intervalo de tiempo en el que el embrión responde a la temperatura es más corto comparado con lo que se conoce por segundo tercio de incubación y es independiente al total de la duración de incubación de los embriones, ya sea en condiciones naturales o controladas. Es necesario conocer y entender la regulación de otros genes involucrados en la determinación sexual por temperatura que participan río-arriba de SOX9. Conocer la cascada fisiológica sensible a la temperatura servirá para entender las

variaciones de la temperatura pivote en la misma especie en términos de la genética de poblaciones y el cambio climático.

## PROPORCIONES SEXUALES OBSERVADAS EN MORRO AYUTA

En la playa Morro Ayuta observamos a lo largo de 3 años de muestreo aleatorio una tendencia de proporción sexual muy cercana al 50%. De los 585 embriones sexados el 60.3% resultaron hembras y el 39.7% restante son machos. En el caso de la muestra poblacional que manejamos de 45 nidos observamos una proporción sexual cercana 1:1 como sugieren los supuestos de la teoría de Fisher (1930). Para poder sugerir valores poblacionales tendríamos que muestrear de manera representativa toda la temporada, en varios años y en distintas zonas de la playa ya que nosotros nos centramos en el desarrollo de embriones incubados en condiciones de corral, como se hace en la mayoría de los santuarios tortugueros donde no ocurren arribadas.

Nuestros resultados obtenidos a partir de la muestra poblacional siguieron que en la misma playa, la temporada del año (mes) podría influir en la determinación sexual por temperatura y por consiguiente, en la proporción de sexos que eclosionan (Fig. 23). Si bien no representamos distintas zonas de la playa pero al usar el mismo corral cada año podemos comparar los nidos muestreados en diferentes meses y observar diferentes temperaturas a lo largo del año o años (figura 24). Esto es lo contrario a lo reportado por Bull & Vogt (1982) en *Dermochelys coriacea*, donde reportan que no hay diferencia significativa en la proporción de sexos en los diferentes meses del año, ni en las diferentes zonas de playa.

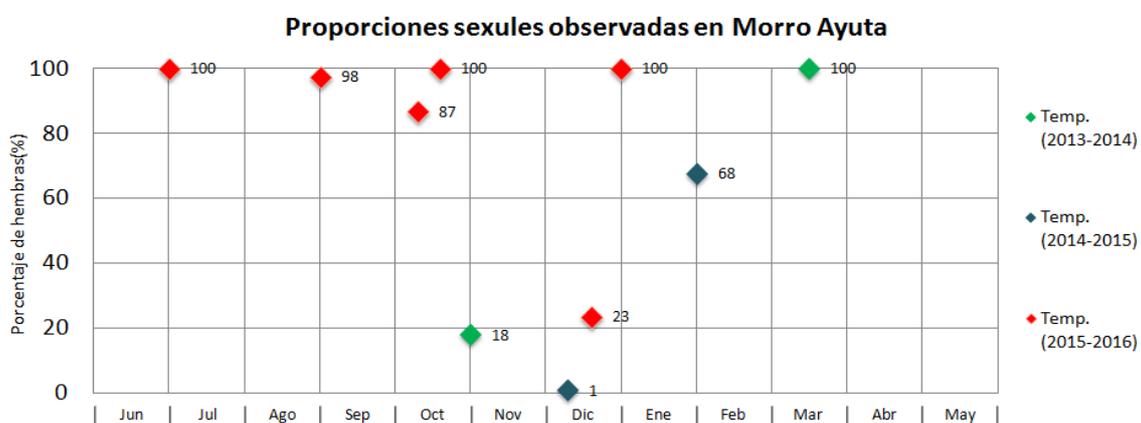


Figura 26. Proporciones sexuales observadas en Playa Morro Ayuta durante 3 temporadas.

En otros trabajos proponen que hay diversos factores que pudieran estar influyendo en la determinación sexual de *L. olivacea* ya que a la misma temperatura se han registrado diferentes proporciones de hembras y machos (Standora & Spotila 1985). Sin embargo están considerando el promedio de temperatura de todo el desarrollo embrionario o bien el segundo tercio (15 días). Al reducir este intervalo de tiempo, el promedio que se maneja para cada nido presenta una desviación estándar menor y el ajuste de regresión no lineal también presenta un valor de  $R^2$  más alto.

## FLUCTUACIONES DIARIAS

A pesar de tener muchas fluctuaciones en los registros de incubación, siendo la mayor diferencia entre el día y la noche, la profundidad del nido ayuda a amortiguar este efecto. A pesar de que nuestros resultados la mayor desviación estándar fue de 1.36 y la menor de 0.31, la magnitud de dichas fluctuaciones no son suficientemente grandes como para tener efecto sobre la tasa de desarrollo del embrión dado que la velocidad de desarrollo y la temperatura tienen una relación casi lineal basándose en registros de temperaturas controladas (Georges et al., 2010).

## PERIODO TERMO-SENSIBLE (PTS)

Bajo condiciones de laboratorio de 26°C constantes, el tiempo total de incubación dura aproximadamente 75 días. Sin embargo, el PTS obtenido en los estudios de intercambio, no es equivalente al segundo tercio del PTS. A 33°C la duración del PTS es de 7 días y a 26°C es de 10 días. Es decir, a pesar de que el desarrollo del embrión sea casi dos veces más lento, el proceso de determinación sexual sigue siendo más corto que el segundo tercio. Por lo tanto, en playa, donde la temperatura más baja registrada según fue de 29°C, nuestros resultados sugieren que el PTS realmente ocurre entre 8-10 días y no el segundo tercio propuesto por Mrosovsky & Pieau (1991).

El periodo termo-sensible se ha descrito en algunas especies de cocodrilos, tortugas y lagartijas, empleando experimentos de intercambio de temperaturas masculinizantes a feminizantes y viceversa. Estos periodos varían según el protocolo experimental, las temperaturas elegidas y el criterio para elegir las

ventanas de tiempo durante las cuales el o los embriones son sensibles a cambios de temperatura (Mrosofsky & Pieau, 1991).

Hasta la fecha la gran mayoría de los estudios en tortugas marinas se refieren al periodo termo-sensible como el segundo tercio del total de la incubación (Sandoval et al., 2017; Hernández-Echeagaray et al., 2012; Sandoval et al., 2011; Leblanc et al., 2012; Spotila et al., 1987; Morreale et al., 1982). Se basan en trabajos clásicos realizados en tortugas de agua dulce, terrestre o marinas y arrojan resultados interesantes con una gran cantidad de información que puede ser interpretada desde diferentes ángulos. Reportan varias combinaciones de intercambios y en la mayoría sus observaciones se basan en la etapa de desarrollo donde detectan un periodo de respuesta a la temperatura y al agrupar dichas etapas el periodo abarca cerca del 33% del total del desarrollo. Sin embargo, si observamos sus resultados y en lugar de agrupar por etapas agrupamos el intervalo de días en que los embriones responden a los cambios, podemos ver que la duración de dicho periodo es casi igual a temperaturas masculinizantes o feminizantes, aun sabiendo que a temperaturas masculinizantes el desarrollo es mucho más lento. (Fig. 23).

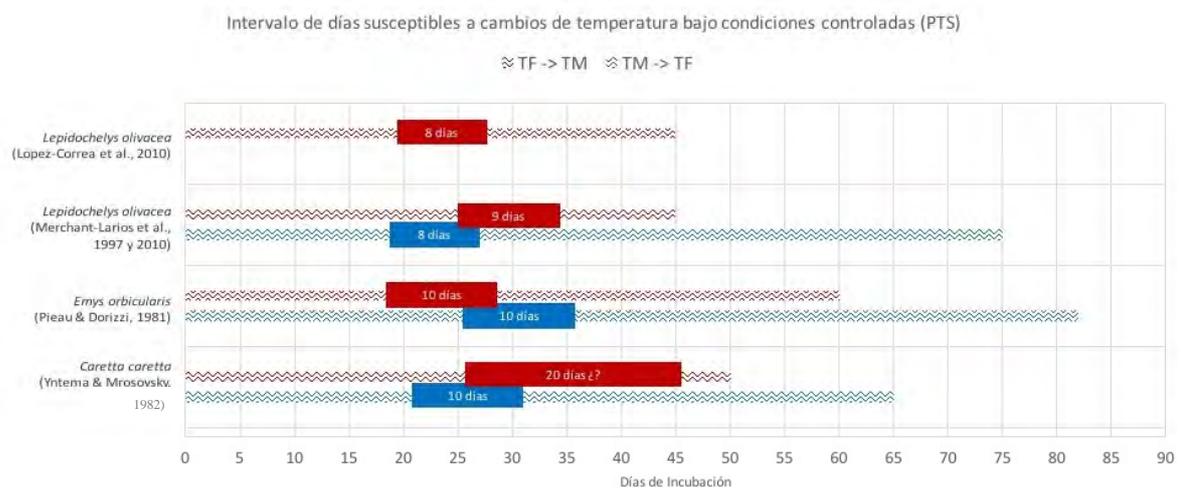


Figura 27. Gráfico comparativo del PTS basado en experimentos de intercambio en diversas especies de tortugas. Las líneas rojas representan los intercambios de TF a TM y las líneas azules representan los intercambios de TM a TF. Los cuadros en cada línea representan el intervalo de días donde observaron que los embriones eran susceptibles a los cambios de temperatura. En el artículo López-Correa et al. (2010) no realizaron experimentos de intercambio de TM a TF.

En especies con DST el sexo se determina cuando un sistema regulatorio es desplazado de manera irreversible en dirección masculinizante o feminizante y el

momento en el que ocurre dependerá de la historia térmica al principio del desarrollo junto con el contexto genético del individuo o especie (Georges et al., 2010). Esta visión ofrece una posible explicación a los pulsos de cambios de temperatura y la respuesta a ellos, como el intervalo de días que observamos en la Figura 22. A pesar de que ocurren en diferentes momentos o etapas, siguen siendo la misma duración a diferentes temperaturas. Por ejemplo, Merchant-Larios et al. (1997) trabajó con embriones incubados a temperaturas controladas de *L. olivacea* y encontró a partir de intercambios de temperaturas masculinizantes (27°C) a feminizantes (32°C) el PTS se encontraba entre la etapa 20 y 24, mientras que de temperaturas feminizantes a masculinizantes se encontraba entre la etapa 23 y 27. El mismo autor repitió dicho experimento (2010) con nuevas temperaturas, masculinizante de 27°C y feminizante de 33°C. En este caso encontró que a partir de intercambios de temperatura masculinizante a feminizante, el PTS estaba entre la etapa 23 y 25 mientras que en intercambios de temperaturas feminizantes a masculinizantes se encontraba entre la etapa 24 y 26.

El efecto que tiene la temperatura en la diferenciación sexual de la gónada en los reptiles ha sido un tema poco estudiado. Si bien la temperatura tiene un efecto acumulativo sobre la velocidad de desarrollo del embrión (Merchant-Larios et al., 1997, Girondot et al. 2014), los presentes resultados sugieren que el periodo de determinación sexual de la gonada conocido como el PTS, sea independiente de la velocidad en que se alcanza las etapas del segundo tercio considerando la duración completa del periodo de incubación del embrión. El hecho es que periodos termo-sensibles similares a Temperaturas Masculinizantes y Feminizantes confirman lo anterior, así como los resultados de expresión de SOX9 en la Playa Morro Ayuta.

Las inmunofluorescencias nos ayudaron a definir que a los 18 días de desarrollo se encontraban en la etapa morfológicamente indiferenciada. Sin embargo; con este solo dato no podemos conocer el momento en que se inicia el PTS. Al relacionar nuestras proporciones sexuales y el perfil de temperatura es muy probable que la determinación sexual ocurra durante el establecimiento inicial de la gónada, antes del día 18. Un ejemplo claro es lo que sucedió en el Nido 1 del Lote 7. Aunque el promedio de temperatura oscilante del primer tercio fue alta, observamos un 20% de machos. Dado que a partir del día 18 las temperaturas se

encuentran por arriba de los 32.5°C, es probable que la determinación de dichos embriones haya ocurrido en días anteriores donde la temperatura bajó hasta los 31.3°C en el día 13 de incubación (31.5°C es el valor de TP reportado en este trabajo). Es importante señalar que en el Lote 7 observamos las etapas 24, 25 y 25/26 en los días 18, 23 y 28 días respectivamente.

**Al conjuntar los presentes datos con lo reportado anteriormente, podemos sugerir que el inicio del PTS en los nidos de PML5 y PML7, se encuentra entre la etapa 21 y 23.** Este resultado coincide con los experimentos de intercambio de 33 °C (TF) a 26 °C (TM) (Merchant-Larios 1997; Merchant-Larios, Díaz-Hernández, & Marmolejo-Valencia 2010). La regulación espacio temporal dimórfica de SOX9 en los cordones medulares ocurre así: entre las etapas 22 y 24 la expresión de SOX9 es independiente de la temperatura ya que es positiva a TF y TM. En la etapa 25 el número de núcleos que expresan SOX9 disminuye considerablemente en TF en tanto que se mantiene similar al de las etapas anteriores en TM. Finalmente, en la etapa 26 el número de núcleos SOX9 negativos y positivos, es claramente distinguible entre ovarios y testículos que ya iniciaron la diferenciación morfológica. El hecho de que nuestros presentes resultados también muestren que en la etapa 25 las gónadas de embriones desarrollados en la playa muestren el inicio dimórfico de la expresión de SOX9, sugiere que el mecanismo molecular involucrado en la diferenciación sexual de la gónada ya se ha iniciado en esta etapa. Al llegar a la etapa 26 en el día 28, el sexo gonadal (ovarios o testículos), se establece de manera irreversible y la temperatura ya no influye en la continuación del proceso que lleva a la diferenciación estructural de las gónadas.

## TEMPERATURA PIVOTE

Con los siguientes resultados buscamos precisamente reducir el número de días que se considera como PTS por otros autores.

La temperatura pivote (TP) se ha definido como la temperatura durante la incubación a temperatura constante, que da 50% de individuos de cada fenotipo sexual. Esta definición es completamente operacional. Simplemente proporciona un término para describir un aspecto de los resultados cuando se realizan experimentos de incubación a temperatura constante (N. Mrosovsky & Pieau,

1991). Hasta la fecha no se ha reportado un valor de TP a partir de observaciones en condiciones naturales donde encuentren una proporción 1:1. Anteriormente se creía que la TP para todas las tortugas marinas se encontraba entre los 28.8-29.7°C (Mrosovsky, 1994), sin embargo estudios recientes en varias especies han confirmado que dicho valor puede variar entre poblaciones. Se visto en otras especies como es el caso de *Graptemys caglei*. Wibbels et al. (1991) reportaron una temperatura pivote de aproximadamente 30°C para una población de *G. caglei* en el rio Guadalupe en Texas que al comparar con otras especies del mismo género eran diferentes, *Graptemys pseudogeographica* en Wisconsin registró una TP de aproximadamente 29.4°C (Bull et al., 1982). Otro caso muy claro es el reportado en una población de tortuga verde (*Chelonia mydas*) en Hawai, la cual presente temperaturas pivote relativamente bajas, comparándola con otras poblaciones de tortuga verde (Wibbels, 1991).

Al asumir que todas las tortugas marinas tienen una TP entre los 29-30°C podríamos sesgar nuestras predicciones al aplicarlo a especies donde esto no fuera correcto. Este valor se obtiene incubando embriones a temperaturas constantes y observando las proporciones sexuales. Sin embargo, para hacer estimaciones en hábitat natural los valores deben corroborarse o ajustarse con observaciones en campo.

Para *L. olivacea* se han reportado diferentes valores de TP (Tabla 5). **Con el paso del tiempo, los nuevos resultados han sugerido que la TP para esta especie está por encima de los 30°C (Mccoy et al., 1983; Wibbels et al., 1998) y nuestros resultados corroboran dicha suposición.** No vamos a suponer que esta TP se puede usar de referencia para otras poblaciones de *L. olivacea* ya que, como se mencionó anteriormente, se deben analizar de manera independiente y al tratarse de una especie tan ampliamente distribuida podrían existir diversos valores de TP en las distintas poblaciones regionales.

**Nosotros observamos una temperatura pivote de 31.5°C, más alta que cualquier otra reportada.** El límite en la distribución de una especie puede estar determinado por la temperatura de los nidos que permite que se produzcan ambos sexos, más que por la temperatura mínima necesaria para el desarrollo embrionario o por las temperaturas adecuadas para el metabolismo de los adultos (Vogt &

Flores-Villela, 1986). La TP y el TRT encontrado a partir de nuestros resultados podría explicar el hecho de que esta especie de tortuga marina sea la de mayor distribución, aunque se necesitaría hacer varios muestreos para poder confirmarlo.

Es importante resaltar que nuestros resultados actuales no muestran nidos con una proporción sexual entre 40-60% de machos o hembras. Por lo tanto, aunque matemáticamente se calculara una temperatura pivote, en la naturaleza no se están presentando estas proporciones sexuales y resulta un valor estrictamente operativo y de diagnóstico más no predictivo.

Bull (1980) propone que la diferencia de TP registradas para las diferentes poblaciones y especies es debido a la carga genética aunque la DST y DSG han sido tratados de manera independiente. Aunado a esto los métodos de diagnóstico son muy variados y tratar de estandarizar el tipo de muestreo y análisis nos podría acercar mucho más a valores reales de TP para cada población.

Si el valor de TP y TRT reportado para otras especies son precisos, entonces *L. olivacea* es la tortuga marina con una TP más elevada y esto puede aumentar sus posibilidades de subsistir y adaptarse a un cambio climático como el que nos estamos enfrentando. Esta característica puede ser una de las razones por las cuales la tortuga golfina ya no se considera en peligro de extinción sino vulnerable (UICN, 2016) aunado al hecho de que anida en forma masiva en las arribadas y al dejar los nidos in situ se mantienen las condiciones naturales de la incubación del nido, a diferencia de lo que ocurre con el resto de las tortugas marinas donde se reubica todos los nidos posibles dejando lugar a un sesgo provocado por las actividades de conservación.

## INTERVALO DE TEMPERATURA DE TRANSICIÓN (TRT, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)

Si bien los valores de temperaturas masculinizantes y feminizantes para todas las tortugas marinas son similares (Ewert, Jackson, & Nelson, 1994), no necesariamente debemos esperar las mismas proporciones sexuales en condiciones naturales. La mayoría de estos valores se obtienen en condiciones controladas de laboratorio donde se somete al embrión a temperaturas extremas para asegurar un 100% de hembras o machos, se debe tener cuidado al extrapolar dichos valores a condiciones naturales sin antes tener datos reales de monitoreo

en campo. Para asegurar o tener un mejor aproximado de una proporción sexual según la playa en la que se esté trabajando es necesario delimitar los valores de temperatura donde observamos un 100% de hembras o machos. A este valor se le conoce como Rango de Temperatura de Transición (TRT por sus siglas en inglés) y a partir de dichos valores se puede estimar una Temperatura Pivote (Mrosovsky & Pieau, 1991). Para *L. olivacea* se han reportado varios intervalos de TRT y la variabilidad de ellos puede deberse a la población que se estudió o el método de análisis de cada autor. En este caso los valores que encontramos para *L. olivacea* en la Playa Morro Ayuta son los más altos reportados hasta la fecha (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de TRT y TP obtenidos por diferentes métodos para la tortuga *L. olivacea*

TRT	TP (1:1)	Localidad	Método de Incubación	Método de sexado	Cita
25°-35°C	alrededor de los 30°	Playa Nancite, Costa Rica	Temperaturas controladas (23, 25, 28, 30 y 32°C)	Disección de gónadas y aclaramiento	(Mccoy, Vogt, & Censky 1983)
28°-32°C	29.9grados (58% H y 42% M)	Playa Cuitzamala, Jalisco, México	Nidos en corral con sombra y regados	Disección de gónadas e histología	Tesis: Silva-Batiz, 1986
27°C	32°C	Playa La Escobilla, Oaxaca, México	Temperaturas controladas (27 y 32°C)	Disección de gónadas e histología	Merchant-Larios et al., 1997
29.4° y 30.4°C (la mayoría machos)	30.4°C o más, cercana a los 31°C	Costa Rica	Temperaturas controladas (32, 30.4, 29.4 y 27°C)	Disección de gónadas e histología	(Wibbels, Rostal, & Byles 1998)
28.5°C-32.5°C		San Jose del Cabo región, Baja California sur, Mexico	Incubadora artificial monitoreada por computadora	Disección de gónadas e histología	Lopez-Correa, Porta-Gándara, Gutierrez & Gómez-Muñoz, 2010
26°-33°C		Playa La Escobilla, Oaxaca, México	Temperaturas controladas (26 y 33°C)	Disección de gónadas e histología y expresión de SOX9	Merchant-Larios et al., 2010
29.95°-32.86°C	29.95°C	4 campamentos: BCS, Sinaloa, Colima y Guerrero: México	In situ	Por estimación modificando el método de Girondot	Tesis: Sarahi Sandoval, 2011
≈29°C – 32.5°C	30°C	Padre Island National Seashore Texas, USA	Temperaturas controladas	Disección de gónadas e histología	(LeBlanc et al. 2012)

29.95°-32.86°C (Sandoval, 2011)	29.95°C (Sandoval, 2011)	La Escobilla, Oaxaca, México	In situ	Disección de gónadas e histología. Embriones vivos y muertos.	(Hernández-Echeagaray et al. 2012)
27.1°C-32.9°C	29.95°C	Diversas localidades	Temperaturas controladas	Estimación a partir de temperaturas durante el segundo tercio	(Sandoval, Gómez Muñoz, and Porta-Gándara, 2017)
30.0° - 33.4°C	31.5°C	Playa Morro Ayuta, Oaxaca, México	Nidos de Corral	Detección de SOX9 en gónadas durante el PTS	Nuestros resultados

Existen supuestos para este rango, si los extremos se encuentran muy cercanos encontraremos más nidos de un solo sexo mientras más amplio encontraríamos nidos con ambos sexos (Mrosovsky & Pieau, 1991). Para *L. olivacea* consideramos que dicho rango es más amplio que lo reportado en otras playas y probablemente eso explica la variabilidad de sexos en los nidos, sin embargo eso no descarta la posibilidad de encontrar nidos con 100% hembras o machos. En este caso el 71.8% de los nidos resultaron de un mismo sexo mientras que el 28.2% restante presentaron ambos sexos. Los extremos de nuestro TRT, estimado en condiciones ambientales de playa, con temperaturas fluctuantes, están separados por 3.4°C, es un rango muy amplio donde aumenta las posibilidades de encontrar machos en los nidos de *L. olivacea*. Dicho rango es el más amplio reportado hasta la fecha.

#### LA IMPORTANCIA DE LA PLAYA MORRO AYUTA COMO ÁREA NATURAL PROTEGIDA

Hasta el momento esta playa no está catalogada como ANP sino Área Prioritaria. El nivel de protección pasa a segundo plano al compararla con otras ANPs. Si la Playa Morro Ayuta es una playa estratégica para esta especie donde observamos una buena producción de machos, está en nuestras manos protegerla y mantenerla como santuario natural. El cambio de uso de suelo y el aumento de zonas urbanas o rurales alrededor de la misma afectan las características térmicas de la playa y limita el área de anidación para ésta y otras especies de tortugas marinas. Aunado a esto, el saqueo es un tema muy importante que se debe tratar de diversos ángulos para poder seguir combatiendo el consumo de huevo y la matanza de tortugas.

HIPÓTESIS: En nidos de playa, la regulación dimórfica de la expresión del gen SOX9 en los cordones medulares de la gónada, está directamente relacionada con la determinación sexual y la duración del periodo sensible a la temperatura de *Lepidochelys olivacea*.

## CONCLUSIONES

La expresión de SOX9 nos ayudó a distinguir si las gónadas de 10 nidos eran testículos potenciales u ovarios potenciales, a partir de la etapa 25 de desarrollo

La regulación dimórfica de SOX9 sugiere que el periodo termo-sensible se reduce a siete días, lo cual es casi la mitad de lo que se clasifica como el segundo tercio de incubación en la playa.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis propuesta ya que la temperatura en la playa durante el primer tercio e inicio del segundo de incubación, influye en la determinación sexual de la tortuga golfina.

La presencia de la proteína codificada por el gen SOX9 en los cordones medulares de las gónadas bipotenciales (etapas 22-24), es independiente del promedio de la temperatura total registrada en los nidos.

La regulación del SOX9, positiva y negativa en testículos y ovarios; respectivamente, mostró diferencias en nidos de playa respecto a lo reportado en el laboratorio: los ovarios en la playa mostraron un retraso considerable en la regulación negativa del SOX9. Lo cual probablemente se deba a la cercanía de la temperatura registrada con la temperatura pivote reportada, comparada con las temperaturas extremas empleadas en laboratorio (33 y 26 °C).

La velocidad en la regulación de la expresión de SOX9 es más diversa entre individuos y nidos en condiciones naturales, que en el laboratorio.

El valor de TP (31.5°C) y el TRT (30.0 – 33.4°C) son los más elevados reportados hasta le momento para *L. olivacea*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Booth, D. T. & Astill, K. 2001. "Temperature Variation Within and between Nests of the Green Sea Turtle, *Chelonia Mydas* on Heron Island, Great Barrier Reef." *Australian Journal of Zoology* 49: 71–84.
- Bull, J. J. 1980. "Sex Determination in Reptiles." *The University of Chicago Press* 55(1): 3–21.
- Bull, J. J., & Vogt, R. . 1982. "Temperature Controlled Sex-Determination in Turtles: Ecological and Behavioral." *Herpetologica, Source Biology, Reproductive* 38(1): 156–64.
- Davidson, E.H. & Erwin, D. H. 2006. "Gene Regulatory Networks and the Evolution of Animal Body Plans. Supporting Material." *Science* 311(5762): 796–800.
- Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A., Harfush-Melendez, M., & Merchant-Larios, Horacio. 2012. "Formation of the Genital Ridges Is Preceded by a Domain of Ectopic Sox9-Expressing Cells in *Lepidochelys Olivacea*." *Developmental Biology* 361(1): 156–66.
- Merchant-Larios, H. 2000. Determinación del sexo en crías. En Eckert, K. L, Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F.A., & Donnelly, M. 2000. "Técnicas de Investigación Y Manejo Para La Conservación de Las Tortugas Marinas." IUCNSSC Marine Turtle
- Ewert, M. A., Jackson, D. R. & Nelson, J. E. 1994. "Patterns of Temperature-Dependent Sex Determination in Turtles." *Journal of Experimental Zoology* 270(1): 3–15.
- Fisher, R. F. 1930. THE GENETICAL THEORY OF NATURAL SELECTION. Oxford University Press.
- Georges, A., Ezaz T., Quinn, A. E.& Sarre, S. D. 2010. "Are Reptiles Predisposed to Temperature- Dependent Sex Determination?" *Sexual Development* 4(1–2): 7–15.
- Georges, A., Beggs, K., Young, J. E. & Doody, J. S. 2005. "Modelling Development of Reptile Embryos under Fluctuating Temperature Regimes." *Physiological and Biochemical Zoology* 78(1): 18–30.
- Girondot, M. 1999. "Statistical Description of Temperature-Dependent Sex Determination in Marine Turtles Using Maximum Likelihood." *Proceedings of the 19th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*: 16–18.
- Girondot M, Kaska Y (2014) A model to predict the thermal reaction norm for the embryo growth rate from field data. *J Therm Biol* 45:96–102
- Grupo Especialista en Tortugas Marinas IANIGLA/SE. 2000. "Técnicas de Investigación Y Manejo Para La Conservación de Las Tortugas Marinas." N° 4 : 260.

- Guth, S. I. E. & Wegner, M. 2008. "Having It Both Ways: Sox Protein Function between Conservation and Innovation." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(19): 3000–3018.
- Hays, G. ., Godley, B. J. & Broderick, A. . 1999. "Turtles on Ascension Island." *Marine Ecology Progress Series* 185: 297–99.
- Hernández-Echeagaray, O. E., Hernández-Cornejo, R., Harfush-Meléndez, M. & García-Gasca, A. 2012. "Evaluation of Sex Ratios of the Olive Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys Olivacea*) on the Arribada Nesting Beach, La Escobilla, Mexico." *Marine Turtle Newsletter* (133): 12–16.
- Hernández-Romero, A. 2015. Regulación del gen Sox9 en gónadas de *Lepidochelys olivacea* desarrolladas en condiciones naturales. (Tesis de licenciatura). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Jakob, S., & Lovell-Badge, R. 2011. "Sex Determination and the Control of Sox9 Expression in Mammals." *FEBS Journal* 278(7): 1002–9.
- Jones, T., & Seminoff, J. A. 2013. "Feeding Biology." *The Biology of Sea Turtles*, Volume III: 211–48. <http://dx.doi.org/10.1201/b13895-10>.
- Kohno, S. et al. 2014. "Gonadal Differentiation in Reptiles Exhibiting Environmental Sex Determination." *Sexual Development* 8(5): 208–26.
- Leblanc, A.M., Wibbels, T., Shaver, D., & Walker, J. S. 2012. "Temperature-Dependent Sex Determination in the Kemp's Ridley Sea Turtle: Effects of Incubation Temperatures on Sex Ratios." *Conservation Biology* 19: 123–28.
- López-Correa, J., Porta-Gándara, M. A., Gutiérrez, J. & Gómez-Muñoz, V. M. 2010. "A Novel Incubator to Simulate the Natural Thermal Environment of Sea Turtle Eggs." *Journal of Thermal Biology*. 35: 138-142.
- Márquez, R. 1996. *Las Tortugas Marinas Y Nuestro Tiempo*.
- Mccoy, . J., Vogt, R. . & Jenkins, E. J.. 1983. "Temperature-Controlled Sex Determination in the Sea Turtle *Lepidochelys Olivacea*." *Journal of Herpetology* 17(4): 404–6.
- Merchant-Larios, M, Ruiz-Ramírez, 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: 373–385.
- 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. & Díaz-Hernández, V. 2012. "Environmental Sex Determination Mechanisms in Reptiles." *Sexual Development* 7(1–3): 95–103.
- Merida, A.M. et al. 2015. "Contrasting Incubation Data for *Lepidochelys Olivacea* Highlight the Need for More Experimentation and Detailed Reporting." *Marine Turtle Newsletter* 145(JANUARY): 15–19.

- Morais da Silva, S. et al. 1996. "Sox9 Expression during Gonadal Development Implies a Conserved Role for the Gene in Testis Differentiation in Mammals and Birds." *Nature genetics* 14(1): 62–68.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V. R. & Merchant-Larios, H. 1999. "Differential Expression of SOX9 in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys Olivacea* at Male- or Female-Promoting Temperatures." *Journal of Experimental Zoology* 284(6): 705–10.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V. R. & Merchant-Larios, H. 2001. "Temperature regulates SOX9 Expression in Cultured Gonads in *Lepidochelys olivacea*, a Species with Temperature Sex Determination". *Developmental Biology* 229: 319-326.
- Morreale, S.J. J., Ruiz, G.J.J., Spotila, J.R. & Standora, E.A. 1982. "Temperature-Dependent Sex Determination: Current Practices Threaten Conservation of Sea Turtles." *Science* 216(4551): 1245–47.
- Mrosovsky, N. 1994. "Sex Ratios of Sea Turtles." *The Journal of Experimental Zoology* 270: 16–27.
- Mrosovsky, N., & Godfrey, M. H. 1995. "Manipulating Sex Ratios: Turtle Speed Ahead!" *Conservation and Biology* 1(3): 238–40.
- Mrosovsky, N., & Pieau, . 1991. "Transitional Range of Temperature, Pivotal Temperatures and Thermosensitive Stages for Sex Determination in Reptiles." *Amphibia-Reptilia* 12: 169–79.
- Mrosovsky, N, & Benabib, M. 1990. "An Assessment of Two Methods of Sexing Hatchling Sea Turtles." *Oecologia* 2: 589–91.
- Mrosovsky, N. & Pieau, . 1991. "Transitional Range of Temperature, Pivotal Temperatures and Thermosensitive Stages for Sex Determination in Reptiles." *Amphibia-Reptilia* 12(2): 169–79.
- Oreal, E. et al. 1998. "Early Expression of AMH in Chickadee Embryonic Gonads Precedes Testicular SOX9 Expression." *Developmental Dynamics* 212(4): 522–32.
- Pieau, . 1982. "Modalities of the Action of Temperature on Sexual Differentiation in Field???developing Embryos of the European Pond Turtle *Emys Orbicularis* (Emydidae)." *Journal of Experimental Zoology* 220(3): 353–60.
- Sandoval, S., Gómez-Muñoz, V., Gutiérrez, J. & Porta-Gándara, M. A. 2011. "Metabolic Heat Estimation of the Sea Turtle *Lepidochelys Olivacea* Embryos." *Journal of Thermal Biology* 36(2): 138–41.
- Sandoval, S., Gómez-Muñoz, V. & Porta-Gándara, M. A. 2017. "Expansion of the Transitional Range of Temperature for Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* from Sex Ratio Data at Controlled Incubation Temperatures." 10(February): 63–65.

- De Santa Barbara, P. et al. 1998. "Direct Interaction of SRY-Related Protein SOX9 and Steroidogenic Factor 1 Regulates Transcription of the Human Anti-Müllerian Hormone Gene." *Molecular and cellular biology* 18(11): 6653–65.
- Shoemaker, .M. , & crews, D. 2009. "Analyzing the oordinated Gene Network Underlying Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20(3): 293–303.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Hudson, Q. J. & Sinclair, A. H. 2007. "Avian Sex Determination: What, When and Where?" *Evolutionary and Genome Research* 117(1–4): 165–73.
- Spotila, J.R., Standora, E. A., Morreale, S.J. J. & Ruiz, G.J. J. 1987. "Temperature Dependent Sex Determination in the Green Turtle (*Chelonia Mydas*): Effects on the Sex Ratio on a Natural Nesting Beach." *Herpetologica* 43(1): 74–81.
- Standora, E. A, & Spotila, J. R.. 1985. "Temperature Dependent Sex Determination in Sea Turtles." *American Society of Ichthyologists and Herpetologists* 1985(3): 711–22.
- Torres-Maldonado, L. C. et al. 2003. "Expression Profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during Temperature Sex Determination in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys Olivacea*." *General and Comparative Endocrinology* 129(1): 20–26.
- Vogt, R. C., & Flores-Villela, O. A. 1986. "Determinación Del Sexo En Tortugas Por La Temperatura de Incubación de Los Huevos." *Ciencia* 37: 21–32.
- Wallace, B. P. et al. 2010. "Regional Management Units for Marine Turtles: A Novel Framework for Prioritizing Conservation and Research across Multiple Scales." *PLoS ONE* 5(12): 1–11.
- Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J.A. & Sinclair, A. H. 1999. "Temperature-Dependent Sex Determination in the American Alligator: AMH Precedes SOX9 Expression." *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 216(4–5): 411–19.
- Western, P. S., Harry, J.L., Graves J. A. M., & Sinclair, A. H. 1999. "Temperature-Dependent Sex Determination: Upregulation of SOX9 Expression after Commitment to Male Development." *Developmental Dynamics* 214(3): 171–77.
- Wibbels, T., Rowan, J. & LeBoeuf, R.. 1998. "Temperature-Dependent Sex Determination in the Red-Eared Slider Turtle, *Trachemys Scripta*." *The Journal of Experimental Zoology* 281(February): 409–16.
- Wibbels, T. 2003. *II The Biology of Sea Turtles Volume II Critical Approaches to Sex Determination in Sea Turtles.*
- Wibbels, T., Bull, J. J. & Crews, D. 1991. "Chronology and Morphology of Temperature-dependent Sex Determination." *Journal of Experimental Zoology* 260(3): 371–81.

- Wibbels, T., Rostal, D., & Byles, R. 1998. "High Pivotal Temperature in the Sex Determination of the Olive Ridley Sea Turtle, *Lepidochelys Olivacea*, from Playa Nancite, Costa Rica." *American Society of Ichthyologists and Herpetologists* 1998(4): 1086–88.
- Wilhelm, D., Palmer, S. & Koopman, P. 2007. "Sex Determination and Gonadal Development in Mammals." *Physiological reviews* 87(1): 1–28.
- Yntema, C. L. 1979. "Temperature Levels and Periods of Sex Determination during Incubation of Eggs of the Lydra *Serpentina*." *Journal of Morphology* 159(1): 17–27.
- Yntema, C. L., Mrosovsky, N. 1982. "Critical Periods and Pivotal Temperatures for Sexual Differentiation in Loggerhead Sea Turtles." *Canadian Journal of Zoology* 60(5): 1012–16.