



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del calor metabólico sobre la
proporción de sexos y supervivencia de
nidos trasplantados de *Lepidochelys olivacea*
en la playa Morro Ayuta, Oaxaca**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Eduardo Eleuterio Colin Hidalgo

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Horacio Merchant Larios

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



El presente trabajo 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.

Reconocimientos

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: CONACYT No. 137721 y PAPIIT No. IN201218.

Este trabajo contó con los permisos de licencia de colecta científica de huevo de tortuga *Lepidochelys olivacea* otorgados por SEMARNAT con números de oficio: SGPA/DGVS/02522/16, SGPA/DGVS/04317/20 y SGPA/DGVS/03001/21.

El presente trabajo conto con el apoyo del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT), Municipio de Santa María Tonameca, Oaxaca, México que forma parte de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de “Ayudante de Investigador SNI III o emérito” durante 2 años.

Agradecimientos académicos

A mi tutor el Dr. Horacio Merchant Larios por su confianza, paciencia y apoyo durante el desarrollo de este trabajo. Le agradezco todo el tiempo dedicado.

Al Dr. Edgar Javier González Liceaga por su asesoría técnica en los tópicos de estadística, además de ser parte del jurado. Agradezco su paciencia y dedicación.

A los integrantes del jurado por su valiosa participación en la revisión de este trabajo:

Dra. Verónica Díaz Hernández por sus acertadas observaciones que mejoraron la claridad del trabajo.

Dra. Leticia Margarita Ochoa Ochoa por sus amables comentarios para mejorar este trabajo.

Dr. Fausto Roberto Méndez de la Cruz por sus sugerencias que pulieron este trabajo.

Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia por su asesoría técnica en las técnicas de laboratorio en general.

Al Biól. José Roberto Cruz Alcántara y el M. en C. Luis Javier Chino Palomo por su apoyo técnico en las actividades de campo y de laboratorio.

A la M. en C. Martha Regina Harfush Meléndez por su apoyo en la obtención de datos de temperatura de nidos y muestras biológicas en campo.

A la M. en C. Andrea Hernández Romero por su apoyo en la obtención de datos de temperatura de nidos y muestras biológicas en campo.

Al Biól. Andrés Mariano Alcántara, a la Biól. María Teresa Luna Medina, al Biól. Ángel Guillermo González Padilla y a la Biól. Erika Peralta Buendía, todos pertenecientes al CMT. Gracias por su apoyo técnico en las actividades de campo.

A la CONANP y el CMT por las facilidades brindadas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente a la Facultad de Ciencias por permitirme desarrollarme de manera académica y personal.

Al CONACYT por su financiamiento.

Agradecimientos personales

A mi abuela Eleuteria Colin, mi segunda madre. Hasta donde estes muchas gracias.

A mi familia, que gracias a su esfuerzo todo ha sido posible. No tengo palabras para expresar mi agradecimiento.

Al Dr. Horacio Merchant por la confianza, consejos, paciencia y apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, Alfredo, Cesar, Eduardo, Erandi, Daniela, Dulce y Omar: especialmente a Alejandra. Gracias por hacer esta etapa de mi vida una de las mejores.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Adriana Castro, Alejandro "Alex" Marmolejo, Andrea Hernández, Luis Chino, Pedro Collazo y Roberto Cruz. Gracias por su amistad, consejos y conversaciones que me ayudaron a hacer el trabajo de laboratorio más divertido e interesante.

A mis amigos de la Prepa 7: Axel, Derek "otakillo", Emanuel "Nova", German, Jesús "jjjjj", Luis "el negrito" y Ramsés "CR7". Gracias por todas las aventuras.

Dedicatoria

***A Eleuteria Colin (†), Enedina Hidalgo, Marco Antonio
Colin y Ariadna Colin. Gracias por todo***

**“A soul in tension that's learning to fly
Condition grounded but determined to try
Can't keep my eyes from the circling skies
Tongue-tied and twisted, just an earth-bound misfit, I”**

Learning to fly – Pink Floyd (1987)

Índice

Abreviaturas	I
Resumen	II
1. Introducción.....	1
1.1 Cambio climático: efecto en los ecosistemas.....	1
1.2 Determinación de sexo en vertebrados.....	2
1.3 Determinación del sexo en reptiles	4
1.4 Determinación del sexo en tortugas marinas.....	4
1.5 Efecto del cambio climático en la proporción de sexos de las tortugas marinas	5
1.6 Calor metabólico y microclima del nido.....	6
1.7 <i>Lepidochelys olivacea</i> como modelo para conocer el efecto del calor metabólico	8
2. Justificación.....	10
3. Objetivo general	10
4. Objetivos particulares.....	10
5. Hipótesis.....	11
6. Material y métodos	11
6.1 Diseño experimental.....	11
6.2 Experimentos con nidos con huevos en desarrollo (NHD) y con huevos simulados (NHS)	12
6.3 Sexado de embriones	14
6.4 Análisis estadísticos	15
7. Resultados	17
7.1 Calor metabólico (CM)	17

7.2	Temperaturas según la ubicación del sensor en los nidos en el experimento Oct-16	19
7.3	Sexado de embriones	21
7.4	Perfiles de Temperatura.....	22
7.5	Nidos de referencia Ene-20	24
7.6	Etapas de desarrollo registradas en Ene-20	25
7.7	Temperatura del PST comparado con el segundo tercio de incubación Ene-20	27
8.	Discusión.....	28
8.1	Calor metabólico	28
8.2	Temperaturas según la ubicación de los huevos en el nido: Oct-16	31
8.3	Temperatura de los nidos y su relación con las variaciones climáticas.....	33
8.4	Importancia de la latitud (playas) en el estudio de la temperatura de los nidos	35
8.5	Etapas de desarrollo en los nidos de referencia Ene-20 : implicaciones en el PST	36
8.6	Temperatura durante el PST de Ene-20	39
9.	Conclusiones.....	40
10.	Bibliografía.....	41

Abreviaturas

CM: Calor metabólico.

CO: Córtex.

CoM: Cordones medulares.

CONANP: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

CU: Complejos urogenitales.

Dmrt1: *Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*.

DSA: Determinación sexual dependiente del contexto ambiental.

DSG: Determinación sexual genética.

DST: Determinación sexual dependiente de la temperatura.

ES: Epitelio superficial.

Foxl2: *Forkhead box L2*.

M: Mesonefros.

NHD: Nido con huevos en desarrollo.

NHS: Nido con huevos simulados.

R: Nido de referencia.

RTT: Rango de las temperaturas de transición.

Sox9: *SRY box 9*.

TF: Temperatura feminizante.

TM: Temperatura masculinizante.

TP: Temperatura pivote.

Resumen

Las tortugas marinas tienen determinación sexual dependiente de la temperatura (DST). Durante el desarrollo embrionario, la gónada bipotencial se diferencia en testículo u ovario según la temperatura de incubación durante el periodo sensible a la temperatura (PST). El rango de las temperaturas de transición (RTT) corresponde a las temperaturas masculinizantes (TM) y feminizantes (TF) que producen 100% machos y hembras, respectivamente. En medio del RTT se ubica la temperatura pivote en la que se determina un 50% de cada sexo. Aunque sabemos que el RTT varía entre especies e intraespecies según la latitud, la mayoría de los estudios se han hecho en el laboratorio empleando temperaturas constantes. En condiciones naturales, los embriones de las tortugas marinas están expuestos a influencias internas y externas. En el presente estudio analizamos el efecto del calor metabólico (CM) sobre la proporción en nidos de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea*. Obtuvimos los perfiles de temperatura en nidos con embriones en desarrollo y en nidos con huevos simulados y analizamos los promedios de los dos tipos de nidos. Los perfiles de temperatura fueron analizados considerando cada uno de los tres tercios y el total de la duración del periodo de incubación. Realizamos dos experimentos en diferentes periodos del año. Encontramos un evidente efecto del CM sobre la temperatura durante el segundo y tercer tercio de la incubación; sin embargo, el efecto del CM sobre la proporción de sexos no fue significativo. Probablemente debido a que, el promedio de temperatura de cada uno de los dos experimentos se ubicó en los límites del RTT: uno fue 100% feminizante y el otro fue prácticamente masculinizante (2.2% de hembras). Nuestros resultados sugieren que, el CM influye sobre la proporción de sexos cuando el promedio de temperatura del segundo tercio se encuentra en valores intermedios del RTT.

1. Introducción

1.1 Cambio climático: efecto en los ecosistemas

El clima es considerado como el promedio de las variaciones en las condiciones atmosféricas (viento, humedad, radiación solar, entre otros) que ocurren durante periodos cortos de tiempo. De esta manera, el cambio climático se refiere al cambio estadísticamente significativo del clima que persiste durante periodos prolongados, y son causados por procesos naturales internos y antropogénicos externos (IPCC, 2019a). Una de las causas más importante del cambio climático antropogénico es la acumulación de gases causantes del efecto invernadero. A partir de la revolución industrial, los gases de efecto invernadero han causado un aumento considerable en la temperatura global (Jia *et al.*, 2019; VijayaVenkataRaman, Iniyar y Goic, 2012).

Si la temperatura del aire superficial de la tierra (tanto en continentes como océanos) tiene un aumento promedio en un periodo largo (generalmente 30 años, aunque puede ser una década únicamente) se le denomina “calentamiento global” (IPCC, 2019a). En el quinto reporte del grupo intergubernamental de expertos sobre cambio climático (IPCC, por sus siglas en inglés), se registró que de 1880 a 2012 hubo un incremento promedio de la temperatura global de 0.85°C (IPCC, 2014). Sin embargo, recientemente se publicó que en algunas regiones del mundo se han registrado aumentos hasta de 1.5°C (Allen *et al.*, 2018). Otras consecuencias del cambio climático son: el aumento del nivel del mar, el aumento de la temperatura y acidificación de los océanos, el derretimiento de los casquetes polares, desertificación, pérdida de ecosistemas y biodiversidad, así como la degradación del suelo (IPCC, 2019b; VijayaVenkataRaman *et al.*, 2012).

El clima influye en la distribución de los ecosistemas y las especies. Cada ecosistema está asociado a un clima, por lo que el cambio climático tiene efecto directo en todos los ecosistemas a nivel global (IPCC, 2014; Leemans y Eickhout, 2004). La literatura disponible da sustento y denota efectos negativos. Thomas *et al.* (2004) evaluaron el riesgo de extinción de la diversidad biológica mundial asociado a la pérdida del hábitat de las especies en 2050 (con una muestra del

20% de la superficie terrestre). Los autores estiman que, en promedio 18% de la diversidad total se perdería. Asociado a esto, Leemans y Eickhout (2004) estimaron la pérdida de los ecosistemas para 2100 con un aumento de temperatura global de 1°C, 2°C y 3°C, siendo los porcentajes promedios 10.4%, 15.9% y 21.9%, respectivamente. En un escenario de cambio climático, varios autores han realizado trabajos proyectando la pérdida de especies de plantas vasculares (van-Vuuren, Sala y Pereira, 2006), de peces de ríos (Xenopoulos *et al.*, 2005) y anfibios y reptiles, que se verán gravemente afectados debido a los efectos negativos sobre su fisiología, su distribución geográfica y mayor sensibilidad a patógenos (Li, Cohen y Rohr, 2012; Sinervo *et al.*, 2010; Winter *et al.*, 2016).

1.2 Determinación de sexo en vertebrados

El proceso de determinación sexual de vertebrados se lleva a cabo en las gónadas durante el desarrollo embrionario. Los factores genéticos y/o ambientales que llevan a la gónada bipotencial a diferenciarse como ovario o testículo han evolucionado considerablemente entre las especies (Merchant-Larios, Díaz-Hernández y Marmolejo-Valencia, 2010, Rhen y Schroeder, 2010). Se distinguen dos procesos de determinación del sexo: (1) la determinación sexual genética (DSG), en la que el sexo es determinado durante la fecundación, por la presencia de cromosomas heteromórficos y/o redes de expresión genética establecidas durante la singamia de los gametos; y (2) la determinación sexual dependiente del contexto ambiental (DSA), en el que factores ambientales afectan el destino sexual de los individuos, modulando las redes de expresión genética gonadal involucradas en la determinación sexual del embrión (Bull, 1980; Rehn y Schroeder 2010; Merchant-Larios, Díaz-Hernández y Cortez, 2021).

Se han logrado avances importantes en el entendimiento de las redes moleculares que llevan a un embrión a diferenciarse en uno de los dos destinos sexuales posibles: hembra o macho. En mamíferos euterios, sabemos que los gametos poseen uno de los dos cromosomas sexuales: X o Y. Todos los ovocitos poseen el cromosoma homomórfico (X); en cambio, los espermatozoides pueden llevar el

cromosoma heteromórfico (Y) o el homomórfico (X). En los mamíferos, el espermatozoide determina el sexo genético. Es decir, si el ovocito es fertilizado por un espermatozoide con el cromosoma sexual Y el cigoto desarrollará un embrión macho (XY); en cambio, si lleva el cromosoma sexual X, el cigoto XX se desarrollará como hembra (XX). De esta manera los machos de los mamíferos son heterogaméticos. Por su parte, en las aves, la evolución de los cromosomas sexuales estableció un sistema de DSG diferente: los machos producen espermatozoides homomórficos (Z), en tanto que las hembras producen ovocitos con el cromosoma sexual Z o W. Es decir, los ovocitos poseen los cromosomas que determinan el sexo del embrión (Graves y Peichel, 2010).

En peces, anfibios y reptiles, encontramos especies con mayor diversidad de sistemas de determinación sexual (Graves, 2008). Además de presentar DSG con cromosomas sexuales heteromórficos X o Y; o bien Z o W (Matsubara *et al.*, 2019; Kawai *et al.* 2009; Kawagoshi *et al.*, 2009), hay especies con DSA. La temperatura de incubación es el factor ambiental más estudiado y se denomina determinación del sexo dependiente de la temperatura (DST) (Bull, 1980; Ferguson y Joanen, 1982).

La mayoría de las especies con DST carecen de cromosomas sexuales (Graves y Peichel, 2010). Las temperaturas de incubación masculinizantes (TM) o feminizantes (TF) difieren entre especies. En algunas especies las temperaturas altas son feminizantes y las bajas masculinizantes, en otras especies ocurre lo contrario, las bajas son masculinizantes y las altas feminizantes (Bull, 1980; Mrosovsky y Pieau, 1991). La temperatura pivote (TP) es un concepto que describe el resultado de una incubación a temperatura constante en la que se obtienen proporciones de sexos cercanas al 50% machos y 50% hembras (Mrosovsky y Pieau, 1991). En organismos con DST hay un periodo sensible a la temperatura (PST) durante el desarrollo embrionario. Dicho periodo corresponde al intervalo de tiempo durante el cual, la gónada embrionaria es sensible a la temperatura de incubación (Bull y Vogt, 1981; Pieau y Dorizzi, 1981). Otro concepto importante es el rango de temperaturas de transición (RTT) que está

delimitado por las TM y las TF, de manera que este intervalo/rango de temperatura es el RTT para un grupo de nidos o una población (Mrosovsky y Pieau, 1991).

1.3 Determinación del sexo en reptiles

Se ha registrado que algunos miembros del grupo Squamata (lagartijas y serpientes) poseen cromosomas Z y W (Kawai *et al.*, 2009; Matsubara *et al.*, 2019), mientras que algunos quelonios (tortugas) poseen cromosomas sexuales X o Y (Kawagoshi, Nishida y Matsuda, 2012; Kawagoshi *et al.*, 2014) y Z o W (Kawagoshi *et al.*, 2009). Incluso hay reptiles que poseen cromosomas sexuales heteromórficos, y pueden cambiar su proporción de sexos en respuesta a temperaturas extremas durante su desarrollo embrionario (Holleley *et al.*, 2015). Por otro lado, los cocodrilos y tortugas marinas poseen DST (Ferguson y Joanen, 1982; Lang y Andrews, 1994; McCoy, Vogt y Censky, 1983; Morreale *et al.*, 1982; Pieau y Dorizzi, 1981; Standora y Spotila, 1985). La DST implica el establecimiento de redes moleculares que llevan a las gónadas bipotenciales de un embrión a desarrollarse como testículos u ovarios en función de la temperatura. Los primeros genes candidatos involucrados en la determinación sexual en vertebrados fueron identificados en mamíferos y aves (Díaz-Hernández *et al.*, 2012; Kettlewell, Raymond y Zarkower, 2000; Murdock y Wibbels, 2003; Rhen y Schroeder, 2010; Shoemaker *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008; Torres-Maldonado *et al.*, 2002), y se han visto diferencias en los patrones de expresión de los genes homólogos en diferentes especies con DSG o con DST (Huang, Ye y Chen, 2017; Merchant-Larios *et al.*, 2010).

1.4 Determinación del sexo en tortugas marinas

Las tortugas se ubican taxonómicamente en el orden Testudines, filogenéticamente considerado como grupo hermano de Archosauria (aves y cocodrilos; Chiari *et al.*, 2012; Crawford *et al.*, 2015). Las siete especies de tortugas marinas en el mundo se ubican en dos familias: Dermochelidae, con solo una especie, *Dermochelys coriacea*; y la familia Cheloniidae, con las especies *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys kempii*,

Lepidochelys olivacea y *Natator depressus* (Guillon *et al.*, 2012). De acuerdo con la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2020), seis especies se encuentran en estado endeble de conservación y de *N. depressus* no se tienen datos suficientes para determinar su estado. Dado que todas las especies de tortugas marinas presentan DST (Binckley *et al.*, 1998; Dalrymple, Hampp y Wellins, 1985; LeBlanc *et al.*, 2012; McCoy *et al.*, 1983; Morreale *et al.*, 1982; Pendoley *et al.*, 2014; Yntema y Mrosovky, 1980), un sesgo significativo en el balance de sexos provocado por el actual calentamiento global puede acelerar su extinción.

1.5 Efecto del cambio climático en la proporción de sexos de las tortugas marinas

Derivado del cambio climático, las afectaciones a las tortugas marinas pueden ir desde la pérdida de las playas de anidación, debido al aumento del nivel del mar y al aumento de tormentas tropicales, hasta cambios en la fenología, ecología y pérdida de nichos como consecuencia del cambio en la temperatura y el pH del mar (ver Wyneken y Lolavar, 2015). Con el calentamiento global, es razonable suponer que las tortugas marinas (y todas las especies con DST) se encuentran en riesgo (Valenzuela *et al.*, 2019), pues su proporción de sexos depende de la temperatura, y un cambio significativo daría como resultado un sesgo en la proporción de sexos. Si las temperaturas de incubación son muy altas, se afecta el éxito de eclosión en los nidos y la movilidad de los neonatos (Fisher, Godfrey y Owens, 2014; Honarvar, O'Connor y Spotila, 2008; Maulany, Booth y Baxter 2012a; 2012b; Valverde *et al.*, 2010). El intervalo máximo de tolerancia a la temperatura para embriones de tortugas marinas se ha registrado entre 35° y 37°C; sin embargo, el rango de tolerancia difiere de acuerdo con la especie (Howard, Bell y Pike, 2014).

Hay estudios que han documentado que el aumento promedio de la temperatura ambiental (Janzen, 1994) y de la arena (Mrosovsky y Provanha, 1992; Öz *et al.*, 2004) afectan la proporción de sexos en varias especies. Un gran número de publicaciones del efecto del cambio climático sobre las tortugas marinas, estiman

un sesgo femenino de las poblaciones (Fuentes, Hamann y Limpus, 2010; Fuentes y Porter, 2013; Hawkes *et al.*, 2007; Laloë *et al.*, 2016; Laloë *et al.*, 2017; Santiadrián-Tomillo *et al.*, 2015) y una disminución en el éxito de eclosión (Saba *et al.*, 2012). El incremento de la temperatura en los nidos tiene un efecto feminizante en varias poblaciones de tortugas marinas. Una revisión mostró que más del 50% de las poblaciones estudiadas tienen un sesgo femenino (Hays, Mazaris y Schofield, 2014). Jensen *et al.* (2018) encontraron un sesgo femenino en una población de *C. mydas*, considerada de las más grandes del mundo. Mrosovsky y Porvanha (1992) encontraron una población de *C. caretta* con sesgo femenino; Binckley *et al.* (1998) encontraron lo mismo en una población de *D. coriacea*. También hay estudios en los que se han encontrado poblaciones ligeramente equilibradas: Esteban *et al.* (2016) registraron playas con crías macho de *E. imbricata* y *C. mydas* (53% y 63% de machos, respectivamente); Marcovaldi *et al.* (2016) registraron que en general, las playas de Brasil tienen un sesgo femenino en las crías de *C. caretta*; sin embargo, algunas tienen porcentajes equilibrados (53% crías hembras). Un caso contrario es el de *N. depressus*, en el que las estimaciones dan un sesgo masculino. Los autores proponen que parte de este sesgo se debe a su alto éxito de eclosión a temperaturas elevadas de incubación y una TP alta relativa a la de otras especies de tortugas marinas (Howard, Pike y Bell, 2015; Stubbs *et al.*, 2014). Aunque en condiciones naturales es imposible que exista una temperatura constante en los nidos, la TP es un criterio que se emplea como una “aproximación” para calcular los sesgos en la proporción de sexos en nidos naturales.

1.6 Calor metabólico y microclima del nido

Se denomina calor metabólico a la energía en forma de calor liberada por los procesos metabólicos que ocurren durante el desarrollo embrionario: transformación de vitelo y albumina en tejidos embrionario y sus desechos como agua y dióxido de carbono (Deeming, 2004). Entre los primeros estudios está el de Hendrickson (1958), quien registró una diferencia de temperatura entre el nido y la arena circundante en *C. mydas* y la atribuyó al calor metabólico liberado por los

embriones. Estudios semejantes han documentado este aumento de temperatura en casi todas las tortugas marinas: en *C. caretta* (Godley *et al.*, 2001; Laloë *et al.*, 2014; Maloney *et al.*, 1990; Zbinden, Margaritoulis y Arlettaz, 2006), *E. imbricata* (Glen y Mrosovsky, 2004; Raj, 1976), *C. mydas* (Broderick *et al.*, 2001; Morreale *et al.*, 1982; Önder y Candan, 2016; Sönmez, 2018), *D. coriacea* (Binckley *et al.*, 1998; García-Grajales *et al.*, 2019; Godfrey, Barreto y Mrosovsky, 1997), *N. depressus* (Hewavisenthi y Parmenter, 2002), y *L. olivacea* (Valverde *et al.*, 2010). En general, en la literatura se registra que el aumento significativo de la temperatura provocado por el calor metabólico ocurre durante el último tercio del periodo de incubación. Como se asume que el PST corresponde al segundo tercio, todavía no queda claro el efecto del calor metabólico sobre la proporción de sexos en los nidos. Tomando en cuenta lo anterior, algunos autores descartan un efecto feminizante (Godley *et al.*, 2001; Maloney *et al.*, 1990; Mrosovsky e Yntema, 1980; Zbiden *et al.*, 2006); sin embargo, otros proponen que sí hay una influencia en la proporción de sexos (Broderick *et al.*, 2001; Godfrey *et al.*, 1997; Önder y Candan, 2016; Sönmez, 2018).

El monitoreo de la temperatura interna de los nidos es esencial, pues su temperatura afecta la tasa de desarrollo de los embriones (Ackerman, 1997), la duración de los periodos de incubación hasta la eclosión y la proporción de sexos (Merchant-Larios *et al.*, 1997). Si la temperatura es muy alta, afecta las aptitudes locomotoras de las crías al emerger (Fisher *et al.*, 2014; Maulany *et al.*, 2012b) y el éxito de eclosión (Maulany *et al.*, 2012a; Valverde *et al.*, 2010). Además, si permanece alta durante el PST puede haber una feminización completa del nido (Broderick, Godley y Hays 2001; Glen y Mrosovsky, 2004). Existen correlaciones entre la temperatura de los nidos y varios factores ambientales (Girondot y Kaska, 2015; Hays *et al.*, 2001; Laloë *et al.*, 2014; Marco, Abella-Perez y Tiwari, 2017; Montero *et al.*, 2018; Mortimer, 1990; Sifuentes-Romero *et al.*, 2018); sin embargo, el calor metabólico también es relevante por el incremento que aporta a la temperatura del nido (Gammon *et al.*, 2020).

En *L. olivacea*, Valverde *et al.* (2010) documentaron valores de calor metabólico en dos eventos de anidación masiva en Costa Rica, ocurridos en noviembre de

2008 y enero de 2009. Para noviembre, durante el segundo tercio de incubación obtuvieron un promedio de 1.76 °C, mientras que para enero un promedio de 1.26 °C con un bajo éxito de eclosión comparado con noviembre, resaltando que este calor encontrado también puede deberse a los procesos de descomposición de materia orgánica dada por los microorganismos en la arena, y no a los embriones en desarrollo.

En el presente estudio realizamos un estudio experimental para abordar el efecto del calor metabólico en la proporción de sexos de la tortuga golfina *L. olivacea* y analizamos su papel en la supervivencia. La supervivencia será evaluada como el porcentaje de crías que emergen a la superficie respecto al número de huevos de cada nido.

1.7 *Lepidochelys olivacea* como modelo para conocer el efecto del calor metabólico

L. olivacea es la tortuga marina más pequeña, presentando un color pardo oscuro como crías, y en estado adulto tienen un color olivo (Pritchard y Mortimer, 1999), por lo que comúnmente se le denomina olivácea u oliva, o el nombre más común: golfina (Peralta y Luna, 2016). Su distribución geográfica de anidación, de acuerdo con Pritchard y Mortimer (1999), se localiza al este (desde Baja California, hasta Colombia) y oeste (Malasia y Tailandia) del océano Pacífico, al sur de Océano Atlántico (desde Guyana a Brasil y este de África) y al norte del Océano Índico (India). De forma similar a las otras especies de tortugas marinas, las hembras de *L. olivacea* salen a desovar de manera solitaria. Sin embargo, en varias playas de India (Shanker, Pandav, y Choudhury, 2003), México (Coria-Monter y Duran-Campos, 2017) y Costa Rica (Valverde *et al.*, 2010), anidan por miles de manera sincronizada, eventos denominados “arribadas” o “anidación masiva” (Hirth, 1980; Dornfeld *et al.*, 2014). En México, de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, se encuentra en peligro de extinción, al igual que las otras cinco especies que anidan en costas mexicanas.

En *L. olivacea*, a una temperatura de incubación constante, la TM en la que se desarrollan 100% machos es de 26°C, mientras que la TF es de 33°C en la que

eclosionan 100% hembras (Merchant-Larios *et al.*, 2010). La TP de esta especie ha sido estimada dentro de un rango variable por diversos autores: McCoy *et al.* (1983) en 30°C; Wibbels, Rostal y Byles (1998) en 30.5°C; y Casthologe *et al.* (2018) en 30.7°C. A nivel molecular de regulación y expresión de genes, la determinación del sexo gonadal ocurre entre las etapas 24 y 25 de desarrollo (Díaz-Hernández *et al.*, 2020; Merchant-Larios *et al.*, 2021), de acuerdo con la tabla de desarrollo propuesta por de Miller, Mortimer y Limpus (2017).

Estudios realizados en playas de Costa Rica (Maulany *et al.*, 2012b; Valverde *et al.*, 2010), registraron que, si la temperatura interna promedio de los nidos sobrepasa los 34°C durante más de 3 días, hay una disminución tanto en el éxito de eclosión, como en su aptitud locomotora. El efecto es más drástico cuando la temperatura llega al intervalo de 35°C y 37°C; los pocos embriones que llegan a emerger presentan disminución o pérdida locomotora (Drake y Spotila, 2002). También se registró un aumento de la temperatura en los nidos con respecto a la arena que podría deberse al calor metabólico (Valverde *et al.*, 2010). Por otro lado, Sandoval (2008) proporciona valores del calor metabólico (como energía transferida de los huevos al sistema), empleando un modelo matemático diferencial basado en el equilibrio de energía dentro del nido, trabajo realizado en las costas de Baja California, México (Sandoval *et al.*, 2011).

2. Justificación

Debido al aumento de temperatura proveniente del calor metabólico sobre la temperatura de incubación, es necesario conocer su efecto sobre la proporción de sexos y/o la viabilidad de las crías, con el fin de fortalecer estrategias de conservación de las tortugas marinas. Sin embargo, los resultados publicados muestran una diversidad existente entre especies, y entre poblaciones de la misma especie en función de la latitud y condiciones fisicoquímicas de las playas. Y en este sentido, el conocimiento preciso del efecto del calor metabólico sobre la DST en la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* en Morro Ayuta, Oaxaca, ofrece una excelente oportunidad para elucidar dicho efecto en el contexto de una playa de anidación masiva con características climáticas y físicas singulares. El análisis de los resultados de este estudio, correlacionado con los datos publicados, contribuirá al diseño de una estrategia de conservación basada en un modelo predictivo local.

3. Objetivo general

Determinar el efecto del calor metabólico en la proporción de sexos en nidos trasplantados de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* en la playa Morro Ayuta, Oaxaca.

4. Objetivos particulares

1. Comparar el efecto del calor metabólico sobre la proporción de sexos en nidos monitoreados en dos periodos distintos.
2. Conocer los perfiles de temperatura en nidos de *L. olivacea* trasplantados en corrales de la playa Morro Ayuta, Oaxaca.
3. Comparar los perfiles de temperatura de los nidos con embriones en desarrollo, con los perfiles de nidos con huevos simulados incubados sincrónicamente.

5. Hipótesis

Cuando los promedios de temperatura de los nidos con huevos simulados durante el segundo tercio son cercanos a los límites del rango de temperaturas de transición, el calor metabólico no influye sobre la proporción de sexos.

6. Material y métodos

6.1 Diseño experimental

Este trabajo se realizó en la playa “Morro Ayuta”, localizada en las costas del océano Pacífico, al sur de México, en el municipio de San Pedro Huamelula, del estado de Oaxaca (Fig. 1). La playa tiene una longitud de 12.7 km desde el faro Morro Ayuta (15°52'23" N, 95°46'36" O) hasta Punta Estrella (15°54'20" N, 95°42'42" O), y es reconocida a nivel nacional por ser la segunda playa más importante en anidación de *L. olivacea*, después de “La Escobilla”, en Oaxaca (DEPC, 2008). A su alrededor se observan parches de vegetación clasificada como selva baja caducifolia y predominantemente terrenos de agricultura temporal (CONABIO y SEMAEDSO, 2018).

Se realizaron dos experimentos piloto en dos periodos en años distintos. Se tomaron tres nidos que se incubaron del 28 de septiembre al 6 de noviembre de 2016 (experimento denominado **Oct-16** de aquí en adelante). Otros cinco nidos se incubaron del 19 de diciembre de 2019 al 2 de febrero de 2020 (**Ene-20**). Los datos de 2016 fueron tomados por Andrea Hernández y Martha Harfush, colaboradores del laboratorio del Dr. Horacio Merchant-Larios (Dep. Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) con permiso expedido de SEMARNAT con número de oficio SGPA/DGVS/02522/16. Los datos de 2019-2020 se obtuvieron por el autor de la tesis con permiso de colecta y manipulación de huevos con número de oficio SGPA/DGVS/04317/20. El procedimiento de trasplante, obtención de muestras biológicas y sexado fue el mismo para los dos experimentos.

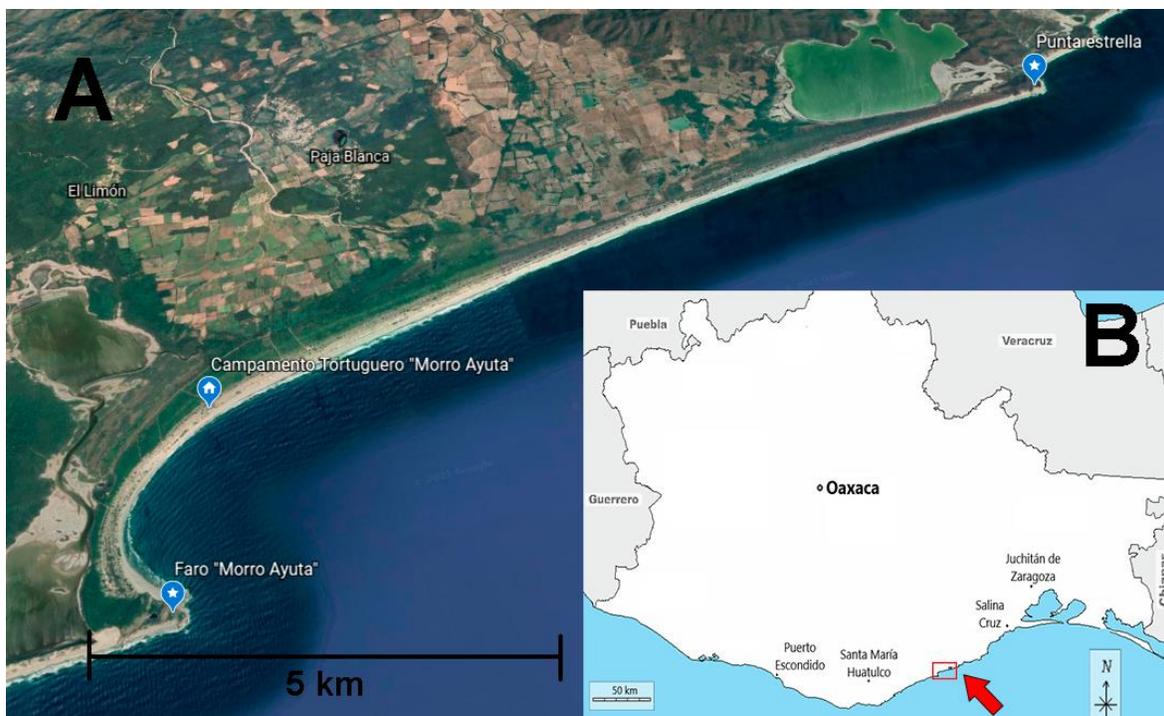


Figura 1. (A) Fotografía satelital obtenida de Google Earth, se muestra mayor detalle de la playa Morro Ayuta. Se encuentran señalados los puntos de referencia que identifican los 12 km de extensión de la playa, así como la ubicación del campamento tortuguero, (B) Mapa del estado de Oaxaca, la flecha roja señala la ubicación de la playa Morro Ayuta (modificado de: dmaps.com, 2022)

6.2 Experimentos con nidos con huevos en desarrollo (NHD) y con huevos simulados (NHS)

Trasplante de NHD: durante la noche, cuando ocurre la anidación, se localizaron hembras desovando. Al término de la ovoposición, se retiró a la tortuga de manera cuidadosa y se hizo un estimado del número de huevos depositados. Los huevos extraídos se almacenaron en bolsas de plástico rellenas de arena húmeda y se transportaron inmediatamente al corral ubicado en el Centro de Protección y Conservación de Tortuga Marina: Morro Ayuta (comúnmente llamado “Campamento tortuguero Morro Ayuta”), que depende de la CONANP. Se contó el número de huevos por nido, y aleatoriamente se acomodaron uno por uno en nidos excavados manualmente, a 45 cm de profundidad (Fig. 2). Finalmente, los nidos fueron cubiertos con la misma arena húmeda retirada previamente al

excavar los nidos, y quedaron bajo resguardo y vigilancia de los miembros del campamento tortuguero y de nuestro grupo de trabajo durante todo el periodo de incubación.

Incubación de NHS: considerando que, el calor metabólico en los NHD resulta de la energía desprendida por la actividad catabólica y anabólica de los embriones, cuyo crecimiento y desarrollo ocurre en un medio acuoso, los NHS pretenden imitar los parámetros físicoquímicos de los NHD, excepto que los NHS carecen de embriones metabólicamente activos. Es decir, los huevos simulados contienen agua, componente físicoquímico correspondiente al ~85% del peso de los huevos en desarrollo (Sandoval, 2008). Los NHS fueron hechos con pelotas de ping pong (Decathlon, modelo Artengo) con un diámetro y volumen similar a los huevos naturales. Los huevos simulados se llenaron con 60 ml de agua purificada empleando una aguja hipodérmica. La perforación hecha con la aguja fue sellada con pegamento instantáneo (marca KolaLoka) para prevenir posibles fugas.

Los NHS sirvieron como controles del calor metabólico generado en los NHD. Para el experimento **Oct-16** se sembró solamente un NHS con 100 pelotas y tres NHD sembrados en el mismo corral (Fig. 2A y D). En el experimento de **Ene-20** se sembraron tres NHD y tres NHS pareados: en cada par de nidos, el número de pelotas de los NHS correspondió al número de huevos naturales de los NHD (Fig. 2B y E). Por otra parte, para determinar las etapas del desarrollo embrionario sin perturbar las condiciones físicas de los NHD destinados a medir el calor metabólico, en el experimento **Ene-20** empleamos dos NHD adicionales, a lo que denominados como “nidos de referencia” (Fig. 2C), de los cuales tomamos huevos a los 18, 23, 28 y 33 días de incubación.

Para los nidos de **Oct-16** se utilizaron sensores de temperatura (Onset, modelo HOBO UA-001-08) con una precisión de 0.53°C dada por el fabricante. Se colocaron tres sensores por nido y distintas ubicaciones del nido: uno en la base, otro en el centro y un último ubicado en la parte superior (Fig. 2A). Por otra parte, para los nidos de **Ene-20** se utilizaron sensores de temperatura (Onset, modelo HOBO MX2201) con una precisión de 0.5°C. En este experimento se emplearon

cinco NHD y tres NHS con un sensor de temperatura en cada uno de ellos. El sensor fue colocado en el centro del nido (Fig. 2B y 2C). Para obtener los perfiles de temperatura los sensores se programaron para registrar la temperatura cada dos horas en ambos experimentos.

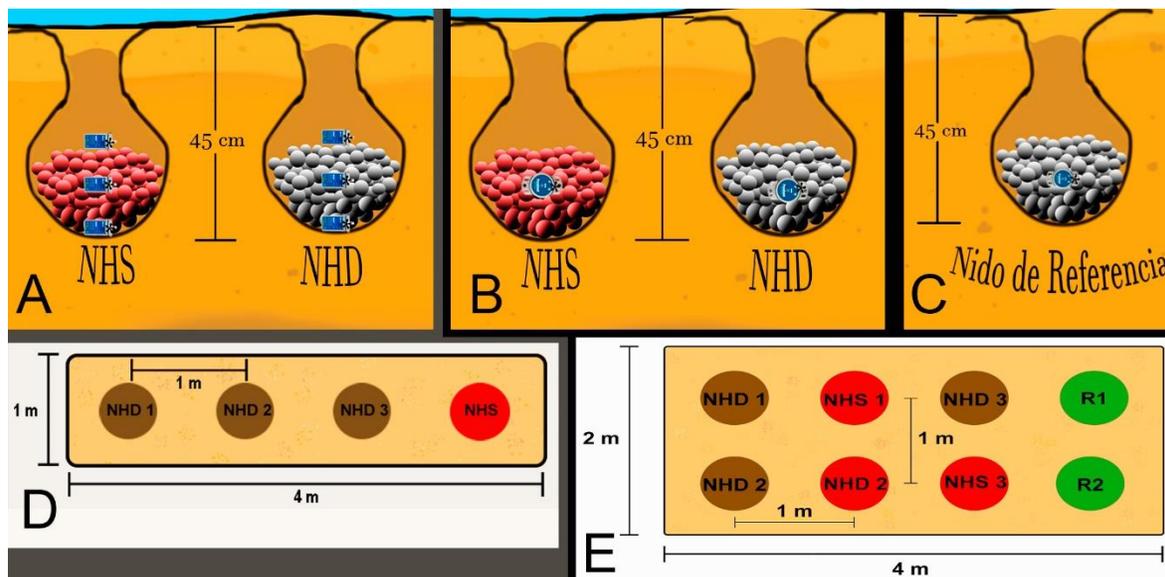


Figura 2. Dibujos de los nidos con huevos en desarrollo (NHD) reubicados en los corrales de estudio en el campamento de Morro Ayuta con sus correspondientes nidos con huevos simulados (NHS). Se muestra la profundidad de los nidos y la posición de los sensores de temperatura (*) en cada caso, así como las dimensiones de los corrales. (A) Experimento **Oct-16**. (B) Experimento **Ene-20**. (C) Nidos de referencia (R1 y R2) del experimento **Ene-20**. (D) Corral de estudio del experimento **Oct-16**. (E) Corral de estudio del experimento **Ene-20**.

6.3 Sexado de embriones

Toma de muestras: se tomó peso y talla (largo recto de caparazón) de 15 crías de cada nido durante el periodo cercano a la eclosión (40-45 días de incubación; etapa 30 de desarrollo). Se realizó la eutanasia (por decapitación) y se disecaron los complejos urogenitales (CU). Los CU se fijaron en solución de Bouin (ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial) a 4°C y se transportaron vía terrestre al laboratorio en Ciudad de México, donde se cambiaron de solución a buffer de fosfatos (PBS) al 1x a 4°C hasta su procesamiento para inclusión en parafina.

Procedimiento histológico:

- 1). Los CU se lavaron con PBS 1x para retirar el exceso de solución Bouin (aproximadamente cuatro lavados de una hora, en movimiento, a temperatura ambiente).
- 2). Se retiró el exceso de tejido con ayuda de tijeras de microcirugía y un microscopio estereoscópico (Zeiss, modelo Stemi 2000-C). Para el proceso de deshidratación de los CU se utilizaron concentraciones de etanol en sentido ascendente (70, 80 y 90%) con duraciones de 30 minutos en cada paso. Para etanol al 100% se realizan dos cambios, cada uno de 20 minutos. Posteriormente se realizaron dos cambios a xilol durante 15 minutos (cada uno). Todos los pasos anteriores se realizaron a temperatura ambiente y en campana de extracción. Finalmente, los CU se cambiaron rápidamente a parafina y se dejaron embebidos durante toda la noche a 60°C.
- 3). Con ayuda de moldes de metal, los CU se incluyeron en bloques de parafina hasta su solidificación. La orientación de los CU se dio de manera que se obtuvieran cortes transversales.
- 4). Los cortes con un grosor de 8µm se realizaron con un microtomo (American Optical, modelo 820). Se tiñeron con la técnica de ácido peryódico – Schiff (PAS) y se observaron al microscopio óptico (Nikon, modelo Alphaphot-2 YS2). Se clasificaron como testículo u ovario según sus características. Se tomaron en cuenta los criterios de Merchant-Larios, Villalpando-Fierro y Urruiza-Centeno (1998).

6.4 Análisis estadísticos

Estimación del calor metabólico: se calculó como diferencia de temperatura entre aquella medida en el centro del NHD y la temperatura medida en el centro del NHS. Se obtuvieron promedios y errores estándar por día, por tercio de incubación e incubación completa.

Proporción de sexos: con la siguiente fórmula se obtuvo un porcentaje de hembras según los resultados de identificación histológica en cada nido.

$$\% \text{ de hembras} = (\text{número de hembras identificadas} / 15) * 100.$$

Manejo de datos de temperatura: Se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk con una significancia de 0.05 para comprobar normalidad de los datos. Debido a que la gran mayoría de los grupos de datos rechazaban la hipótesis nula y no se cumplía con el supuesto de normalidad, se optó por la realización de pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con una significancia de 0.05, mismas que se aplicaron para todos los análisis de comparación.

Se utilizaron los softwares Excel (Microsoft Office 365©, 2011) y R (R Core Team©, 2020, versión 4.0.2) para el manejo de datos y la realización de los gráficos presentados. SPSS Statistics 25.0 (IBM©, 2017) se utilizó para las pruebas estadísticas.

7. Resultados

7.1 Calor metabólico (CM)

Calculando el CM como la diferencia entre las temperaturas promedio registradas en el centro de los NHD y NHS, obtuvimos los valores para cada uno de los tercios de incubación. Así:

- a) Experimento **Oct-16**: el primer tercio tuvo un valor promedio de $0.19 \pm 0.03^{\circ}\text{C}$, el segundo de $0.38 \pm 0.04^{\circ}\text{C}$ y el tercero fue de $1.48 \pm 0.04^{\circ}\text{C}$ (Tabla 1). A partir del día 37 se observó una disminución del calor metabólico, sin embargo, no es significativa comparada con los días 38, 39 y 40 ($H = 0.822$, $p = 0.370$).
- b) Experimento **Ene-20**: el primer tercio tuvo un valor de $0.21 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$, el segundo de $0.51 \pm 0.03^{\circ}\text{C}$, y el tercero fue de $1.76 \pm 0.07^{\circ}\text{C}$ (Tabla 1). A partir del día 42 se observó una disminución del calor metabólico, sin embargo, no es significativa comparada con los días 43 y 44 ($H = 1.60$, $p = 0.206$).

Tabla 1. Promedios de calor metabólico para cada nido durante diferentes periodos de incubación, número de huevos y porcentaje de hembras. Los números en negritas son promedios por experimento. ES = error estándar.

Nido	Experi- mento	No. de huevos	Calor metabólico (ES) [$^{\circ}\text{C}$]				% de hembras (n = 15)
			1° tercio	2° tercio	3° tercio	Toda la incubación	
1	Oct-16	89	0.26 (0.06)	0.50 (0.06)	1.55 (0.06)	0.77 (0.09)	100
2	Oct-16	71	0.10 (0.05)	0.33 (0.07)	1.54 (0.07)	0.64 (0.10)	100
3	Oct-16	91	0.21 (0.06)	0.31 (0.07)	1.39 (0.07)	0.63(0.59)	100
Promedio Oct-16			0.19 (0.03)	0.38 (0.04)	1.48 (0.04)	0.68 (0.05)	100
1	Ene-20	74	0.09 (0.01)	0.43 (0.06)	1.58 (0.06)	0.73 (0.10)	6.6
2	Ene-20	78	0.44 (0.01)	0.71 (0.05)	1.95 (0.10)	1.06 (0.10)	0
3	Ene-20	72	0.1 (0.04)	0.40 (0.04)	1.76 (0.17)	0.78 (0.12)	0
Promedio Ene-20			0.21 (0.02)	0.51 (0.03)	1.76 (0.07)	0.86 (0.06)	2.2

c) Análisis comparativo de ambos experimentos: considerando todo el periodo de incubación, ambos experimentos mostraron un patrón similar (Fig. 3). Se registraron valores promedio similares entre los dos experimentos: $0.68 \pm 0.05^\circ\text{C}$ para **Oct-16**, y $0.86 \pm 0.06^\circ\text{C}$ para **Ene-20** (Tabla 1). No se encontraron diferencias significativas entre experimentos ($H = 3.52$, $p = 0.061$). Sin embargo, si restringimos los datos a los tercios segundo y tercero, sí se encontraron diferencias estadísticas significativas ($H = 5.163$, $p = 0.023$ y $H = 7.731$, $p = 0.005$, respectivamente). En el tercer tercio, el CM se volvió más evidente (Fig. 3), con valores superiores a 1°C (Tabla 1).

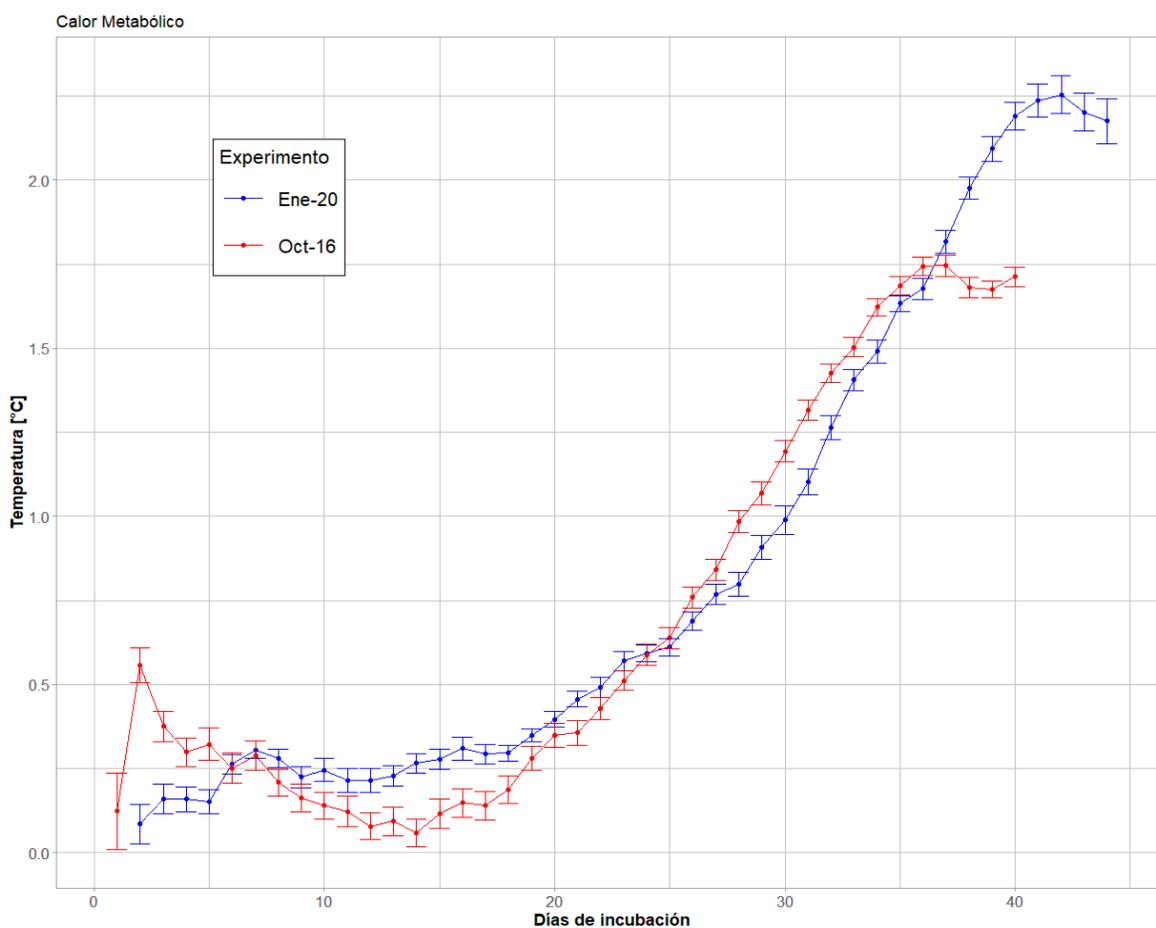


Figura 3. Perfiles de calor metabólico de ambos experimentos. Se muestran los promedios diarios de los nidos ($n = 3$) por experimento y barras de error estándar.

7.2 Temperaturas según la ubicación del sensor en los nidos en el experimento

Oct-16

- a) Perfiles de temperatura: Los perfiles de temperatura de los NHD 1 y 2 compartieron un mismo patrón: en el centro del nido el promedio de las temperaturas fue más altas que las registradas en las ubicaciones superior e inferior (Fig. 4A y 4B). Sin embargo, el patrón del NHD 3, mostró una temperatura mayor en la parte superior a las registradas en las ubicaciones central e inferior (Fig. 4C). Finalmente, los perfiles en las tres ubicaciones del NHS tuvieron patrones casi idénticos (Fig. 4D).

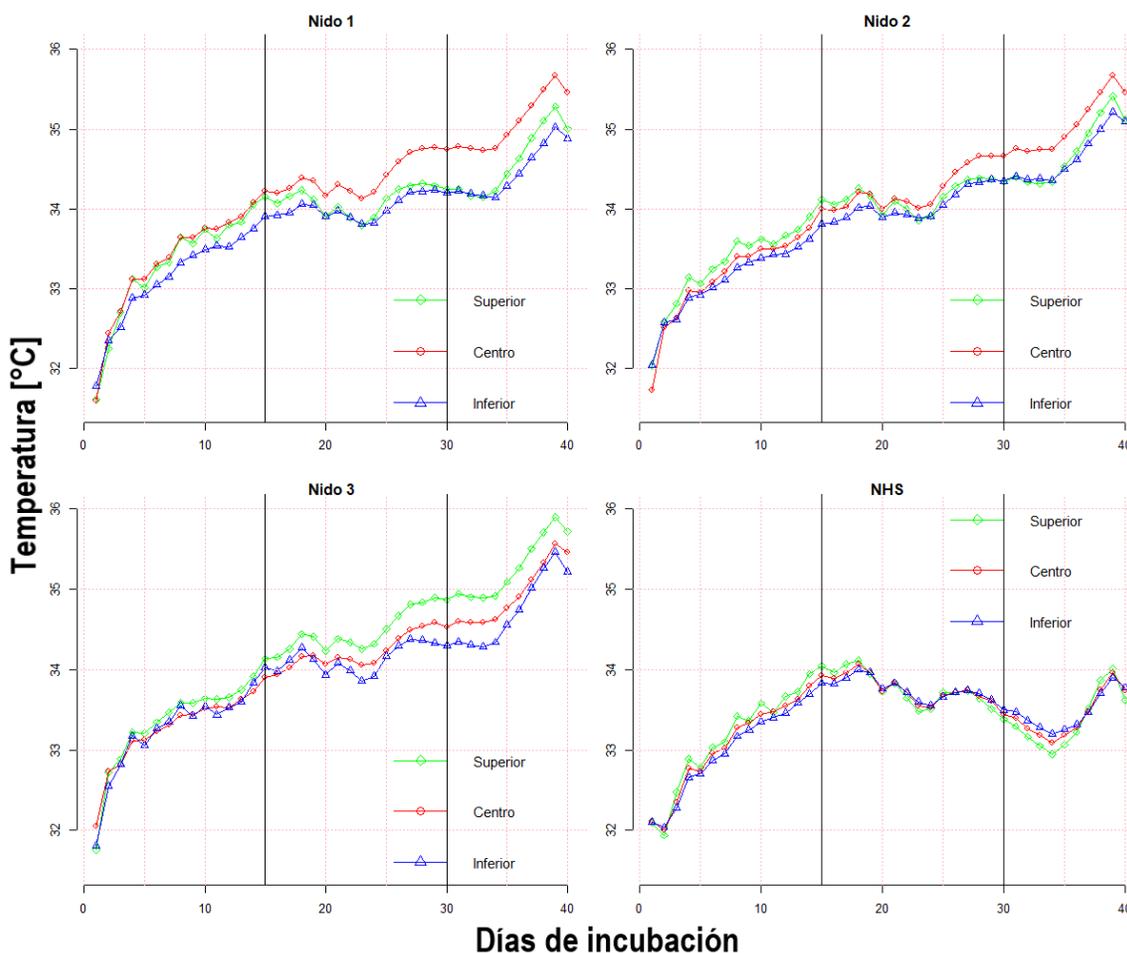


Figura 4. Perfiles de temperatura de las diferentes regiones de los NHD y el NHS de **Oct-16**. En verde se dibuja el perfil de la parte superior del nido, en azul la parte inferior del nido y en rojo el centro del nido. Promedios diarios por nido. A) NHD 1. B) NHD 2. C) NHD 3. D) NHS.

b) Valores promedio por ubicación del sensor durante todo el periodo de incubación: en el centro se registró un valor de $34.1 \pm 0.07^\circ\text{C}$, mientras que en la parte superior y el fondo fue de $34.06 \pm 0.07^\circ\text{C}$ y $33.87 \pm 0.06^\circ\text{C}$, respectivamente. Estadísticamente no se observaron diferencias entre el centro y la parte superior ($H = 6.188, p = 1$), ni entre la superior e inferior ($H = -27.212, p = 0.128$). En cambio, los promedios de temperaturas registradas en las ubicaciones inferiores y del centro sí mostraron diferencias significativas ($H = 33.4, p = 0.039$). La diferencia promedio entre el centro y la parte superior fue de 0.04°C , mientras que entre el centro y la parte inferior mostró una diferencia de 0.23°C . El NHS no registró diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios de temperatura para los nidos de **Oct-16** durante diferentes periodos de incubación de acuerdo con su ubicación dentro del nido. Promedio [$^\circ\text{C}$] (error estándar). ^a significa diferencias significativas con la parte superior del nido. ^b significa diferencias significativas con el centro del nido. ^c significa diferencias significativas con la parte inferior del nido.

Ubicación	NHD 1	NHD 2	NHD 3	Promedio	NHS
Primer tercio					
Superior	33.18 (0.18)	33.22 (0.13)	33.26 (0.15)	33.22 (0.09)	33.04 (0.16)
Centro	33.24 (0.18)	33.08 (0.14)	33.18 (0.12)	33.17 (0.08)	32.97 (0.15)
Inferior	33.03 (0.15)	33.03 (0.11)	33.16 (0.14)	33.07 (0.07)	32.90 (0.14)
Segundo tercio					
Superior	34.04 (0.03) ^b	34.06 (0.03)	34.31 (0.05) ^{b, c}	34.14 (0.03) ^c	33.82 (0.05)
Centro	34.27 (0.03) ^{a, c}	34.09 (0.04) ^c	34.08 (0.04) ^a	34.14 (0.02) ^c	33.79 (0.04)
Inferior	33.92 (0.02) ^b	33.92 (0.03) ^b	34.04 (0.04) ^a	33.96 (0.02) ^{a, b}	33.77 (0.03)
Tercer tercio					
Superior	34.51 (0.10) ^b	34.62 (0.10) ^b	35.16 (0.10) ^c	34.69 (0.06) ^c	33.43 (0.08)
Centro	34.99 (0.09) ^{a, c}	34.94 (0.09) ^{a, c}	34.83 (0.10)	34.88 (0.05) ^c	33.48 (0.07)
Inferior	34.40 (0.08) ^b	34.57 (0.08) ^b	34.63 (0.11) ^a	34.47 (0.04) ^{a, b}	33.52 (0.05)
Toda la incubación					
Superior	33.93 (0.11)	33.98 (0.10)	34.26 (0.13)	34.06 (0.07)	33.43 (0.08)
Centro	34.19 (0.13) ^c	34.06 (0.13)	34.05 (0.12)	34.1 (0.07) ^c	33.42 (0.07)
Inferior	33.8 (0.10) ^b	33.86 (0.11)	33.96 (0.11)	33.87 (0.06) ^b	33.40 (0.07)

Pruebas de Kruskal-Wallis, con una significancia de $\alpha=0.05$

c) Valores de temperatura por tercios del periodo total de incubación: para el primer tercio no hubo diferencias entre las tres ubicaciones de cada nido. Durante el segundo tercio, la parte superior y central del nido tampoco mostró diferencias ($H = 3, p = 1$); sin embargo, se observó una diferencia significativa entre el centro y la ubicación inferior del nido ($H = 34.53, p < 0.05$), así como entre la parte superior e inferior del nido ($H = -31.53, p < 0.05$), en ambos casos con una diferencia promedio de 0.18°C . Por otra parte, en el tercer tercio tampoco hubo diferencias significativas entre la parte superior y el centro del nido ($H = 15.48, p = 0.052$), mientras que el centro y la parte inferior sí mostraron diferencias significativas ($H = 35.47, p < 0.05$), con una diferencia promedio de 0.7°C , así como entre las ubicaciones superior e inferior ($H = -19.98, p = 0.036$), con una diferencia promedio de 0.22°C . Finalmente, el NHS no registró diferencias significativas entre las tres ubicaciones en todos los tercios (Tabla 2).

7.3 Sexado de embriones

Se realizó el protocolo de inclusión en parafina para obtener cortes histológicos para identificar la diferenciación histológica de ovarios (Fig. 5A) y testículos (Fig. 5B).

a) Descripción histológica: los cortes histológicos de gónadas con cordones medulares en crecimiento y un epitelio superficial formado por una capa de células epiteliales se clasificaron como testículos (Fig. 5B). Por otro lado, aquellas gónadas que mostraron un epitelio superficial multiestratificado (denominado córtex) y cordones medulares en regresión y/o lagunares, se clasificaron como ovarios (Fig. 5A).

- b) Proporciones sexuales en ambos experimentos: el experimento **Oct-16** mostró nidos con 100% de hembras. Por otro lado, para **Ene-20** prácticamente los nidos carecieron de hembras (2.2%), con excepción del NHD 1 en el que se encontró una hembra (Tabla 4).

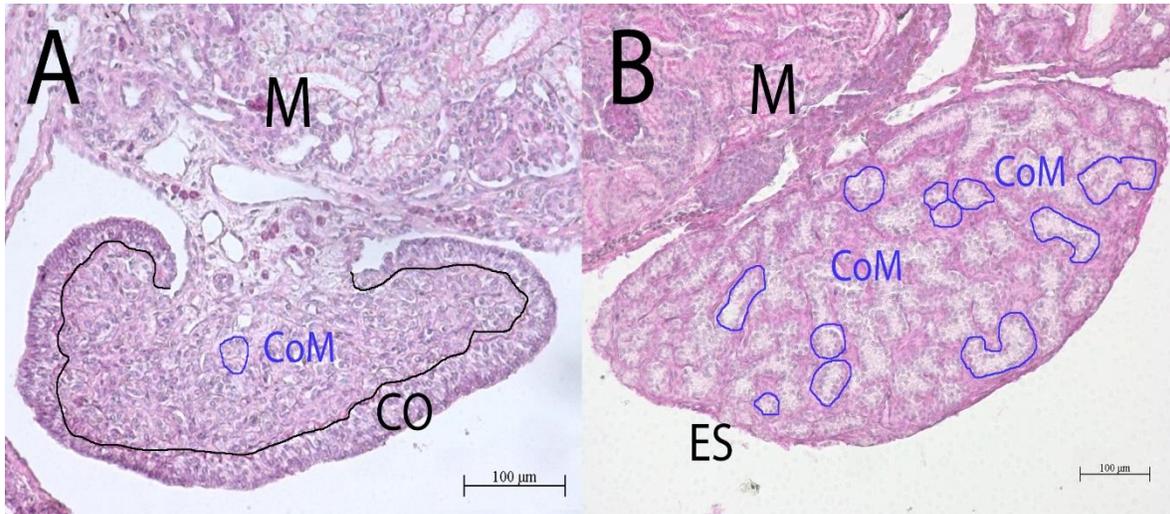


Figura 5. Fotografías de cortes histológicos de los complejos urogenitales teñidos con la técnica de PAS. (A) Ovario caracterizado por un córtex (CO) y remanentes de cordones medulares (CoM). (B) Testículo caracterizado por un epitelio superficial (ES) delgado y cordones medulares evidentes (CoM). M= Mesonefros.

7.4 Perfiles de Temperatura

- a) Experimento **Oct-16**: Dividiendo en tercios de incubación los perfiles de temperatura obtenidos, encontramos lo siguiente: para los NHD, durante el primer tercio tuvieron una temperatura promedio de $33.17 \pm 0.08^{\circ}\text{C}$, mientras que para el segundo tercio fue de $34.17 \pm 0.03^{\circ}\text{C}$, y finalmente en el tercer tercio mostraron $34.95 \pm 0.05^{\circ}\text{C}$. Por otro lado, el NHS presentó durante el primer tercio una temperatura promedio de $32.97 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$, para el segundo tercio un promedio de $33.79 \pm 0.04^{\circ}\text{C}$ y finalmente en el tercer tercio $33.46 \pm 0.05^{\circ}\text{C}$ (Fig. 6; Tabla 3).
- b) Experimento **Ene-20**: Los NHD presentaron una temperatura promedio durante el primer tercio de $29.81 \pm 0.09^{\circ}\text{C}$, mientras que para el segundo tercio fue de $30.32 \pm 0.09^{\circ}\text{C}$, y finalmente en el tercer tercio de $32.22 \pm$

0.1°C. Para los NHS hubo una temperatura promedio durante el primer tercio de $29.64 \pm 0.08^\circ\text{C}$, mientras que para el segundo tercio fue de $29.8 \pm 0.07^\circ\text{C}$, y finalmente en el tercer tercio de $30.45 \pm 0.08^\circ\text{C}$ (Fig. 6; Tabla 3).

Tabla 3. Promedios de temperatura para cada nido durante diferentes periodos de incubación, número de huevos, su porcentaje de hembras y días de incubación hasta emergencia. Los números en negritas son promedios por experimento. * = valores no aplicables. + = nidos que tenían sombreado natural por vegetación. ES = error estándar.

Nido	Experi- mento	No. de huevos	Temperatura promedio (ES) [°C]				% de hembras (n = 15)	Días de incubación
			1° tercio	2° tercio	3° tercio	Toda la incubación		
1	Oct-16	89	33.24 (0.18)	34.30 (0.04)	35.01 (0.09)	34.19 (0.13)	100	40
2	Oct-16	71	33.08 (0.14)	34.12 (0.05)	34.97 (0.09)	34.06 (0.13)	100	40
3	Oct-16	91	33.18 (0.12)	34.11 (0.05)	34.86 (0.1)	34.05 (0.12)	100	40
Promedio Oct-16 NHD			33.17 (0.08)	34.17 (0.03)	34.95 (0.05)	34.1 (0.07)	100	40
Promedio Oct-16 NHS			32.97 (0.15)	33.79 (0.04)	33.46 (0.07)	33.42 (0.07)	*	*
1	Ene-20	74	30.23 (0.08)	30.76 (0.12)	32.59 (0.09)	31.21 (0.16)	6.6	44
2	Ene-20	78	30.12 (0.1)	30.59 (0.1)	32.51 (0.12)	31.12 (0.17)	0	44
3+	Ene-20	72	29.11 (0.09)	29.6 (0.09)	31.56 (0.16)	30.11 (0.17)	0	44
Promedio Ene-20 NHD			29.81 (0.09)	30.32 (0.09)	32.22 (0.1)	30.81 (0.1)	2.2	45
1	Ene-20	*	30.17 (0.07)	30.32 (0.06)	31 (0.07)	30.51 (0.06)	*	*
2	Ene-20	*	29.68 (0.09)	29.88 (0.05)	30.56 (0.06)	30.05 (0.07)	*	*
3+	Ene-20	*	29.06 (0.05)	29.19 (0.06)	29.8 (0.06)	29.36 (0.06)	*	*
Promedio Ene-20 NHS			29.64 (0.08)	29.80 (0.07)	30.45 (0.08)	29.98 (0.05)	*	*

- c) Análisis comparativo de los dos experimentos: Considerando el periodo total de incubación, encontramos evidentes diferencias entre los dos experimentos. Los nidos del experimento **Oct-16** tuvieron temperaturas significativamente superiores a los del experimento **Ene-20** desde el inicio de la incubación (Fig. 6). Los NHD del experimento **Oct-16** presentaron una temperatura promedio de $34.1 \pm 0.07^\circ\text{C}$, en tanto que los NHD del experimento **Ene-20** mostraron una temperatura promedio de $30.81 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (Tabla 3). De la misma manera, los NHS **Oct-16** tuvieron $33.42 \pm 0.07^\circ\text{C}$, mientras que los **Ene-20** tuvieron $29.98 \pm 0.05^\circ\text{C}$ (Tabla 3). La duración del

periodo total de incubación fue menor en el experimento **Oct-16** (40 días) que en **Ene-20** (44 días).

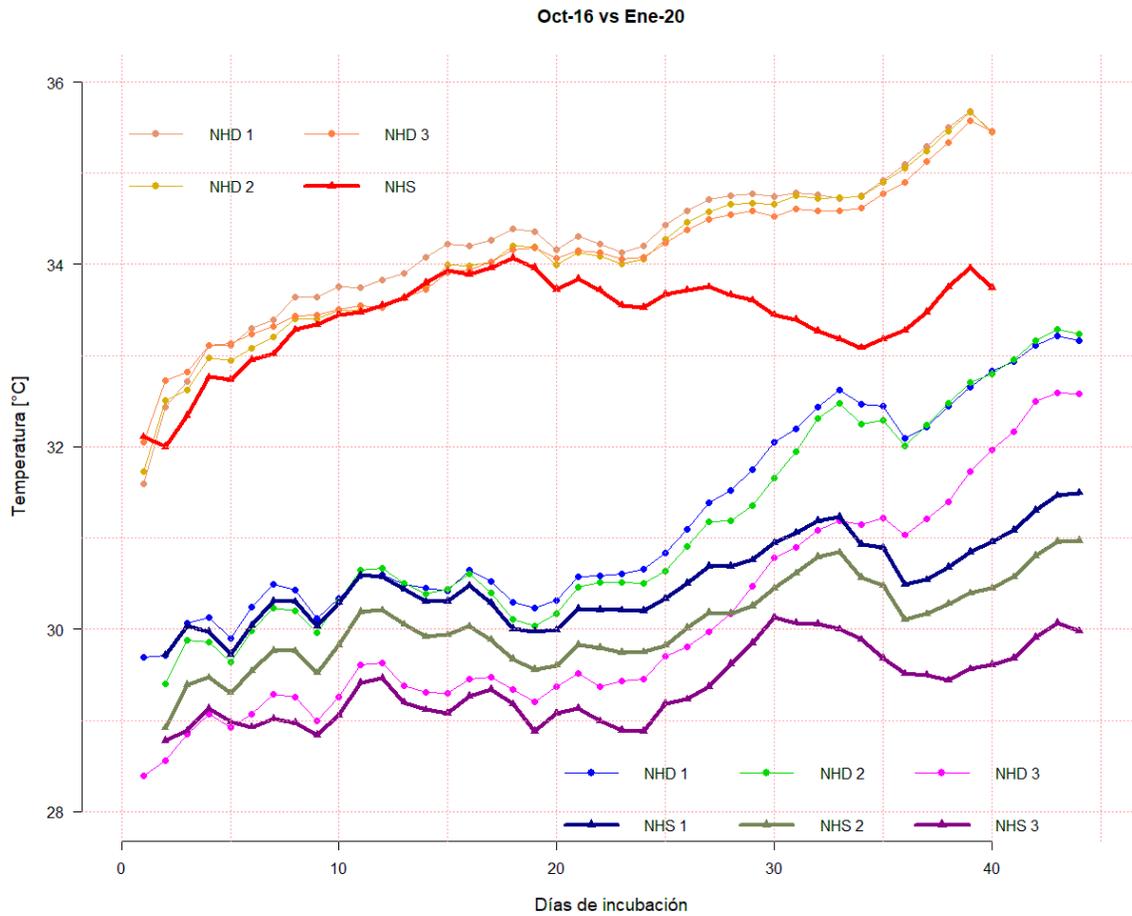


Figura 6. Perfiles de temperatura de los NHD de ambos experimentos. Se muestran los promedios diarios. Los colores amarillo naranja y rojo corresponden a los del experimento **Oct-16**. Los colores verde, azul y morado corresponden a los del experimento **Ene-20**. Las líneas gruesas representan los NHS en ambos casos.

7.5 Nidos de referencia Ene-20

Las comparaciones de los valores y perfiles de temperatura entre los nidos de referencia y los NHD correspondientes al experimento de **Ene-20** nos permite valorar la validez de extrapolar las etapas de desarrollo registradas en los nidos de referencia (Fig. 7). El nido de referencia 1 (R1) no mostró diferencias significativas con los NHD 1, 2 y 3. El nido de referencia 2 (R2) no mostró diferencias

significativas con el NHD 3 (Tabla 4). Hubo diferencias significativas entre los nidos R1 y R2, siendo 0.5°C promedio.

7.6 Etapas de desarrollo registradas en Ene-20

Los embriones de los nidos de referencia fueron muestreados a los 18, 23, 28 y 33 días de incubación, y se encontraron en las etapas 23, 24, 25 y 27, respectivamente (Fig. 8).

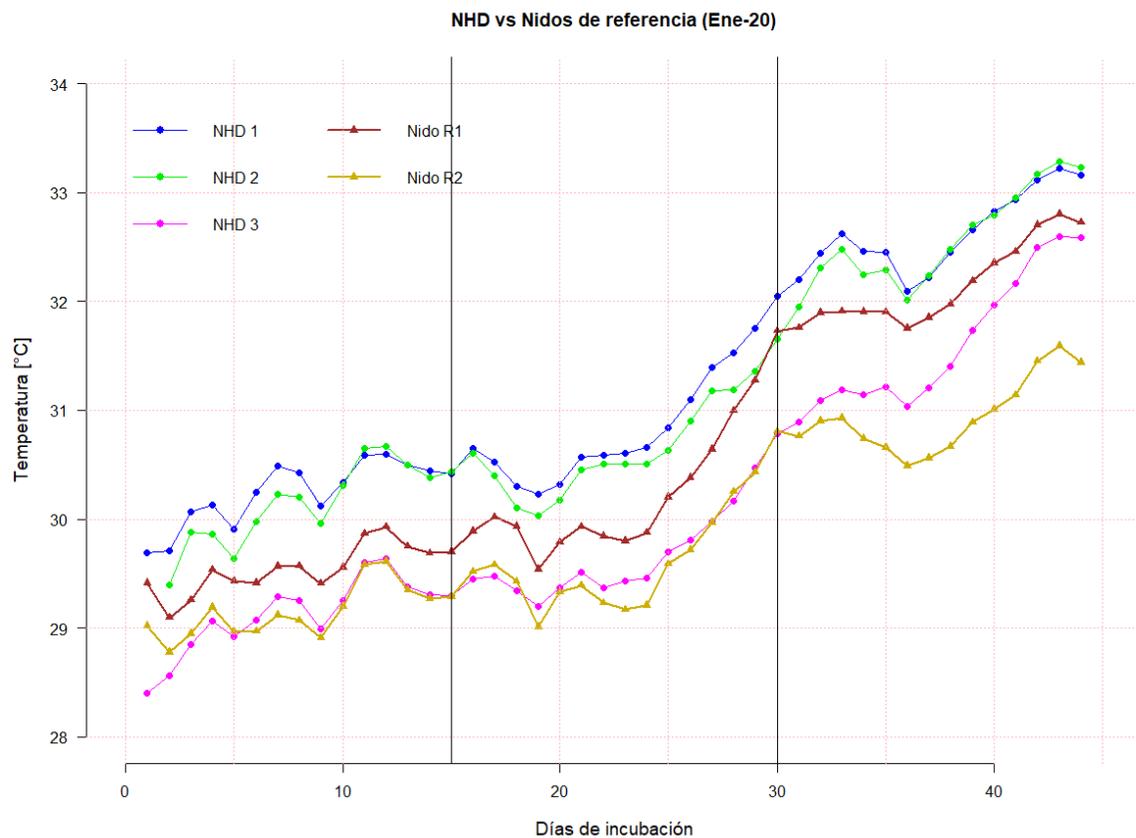


Figura 7. Perfiles de temperatura de los NHD y de los nidos de referencia de **Ene-20**. Se muestran los promedios diarios. Los perfiles con remate en triángulo y colores café y dorado representan a los nidos de referencia 1 (R1) y de referencia 2 (R2), respectivamente. Las líneas verticales negras dividen el periodo de incubación en tercios.

Tabla 4. Resultados de pruebas estadísticas entre los datos de temperatura de los NHD y los nidos de referencia (R1 y R2) del experimento **Ene-20**. Las celdas en amarillo resaltan las diferencias estadísticas significativas.

	NHD 1	NHD 2	NHD 3	R1
NHD 1				
NHD 2	H = 7.84, $p = 1$			
NHD 3	H = 62.61, $p < 0.05$	H = 54.77, $p = 0.01$		
R1	H = -29.35, $p = 0.3$	H = -21.51, $p = 1$	H = 33.26, $p = 0.14$	
R2	H = -73.26, $p < 0.05$	H = -65.42, $p < 0.05$	H = -10.64, $p = 1$	H = 43.9, $p = 0.01$

Pruebas de Kruskal-Wallis con una significancia de $\alpha = 0.05$.

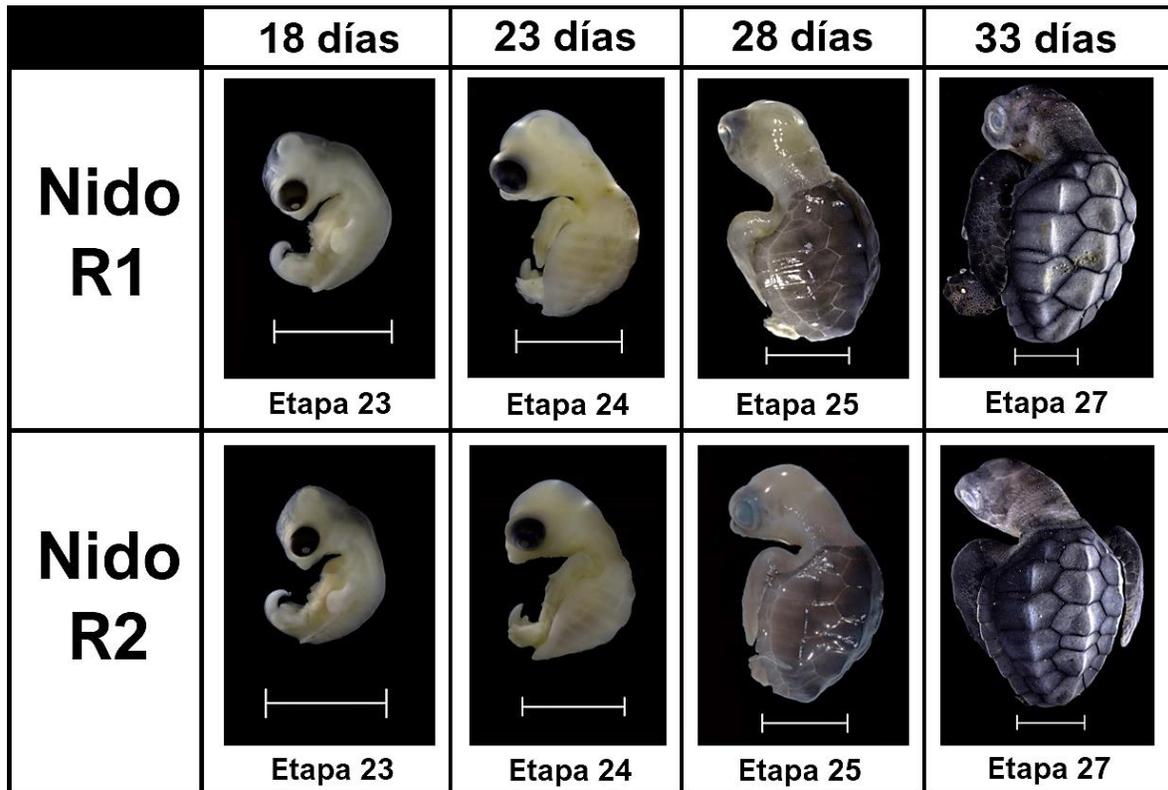


Figura 8. Etapas de desarrollo documentadas para los nidos de referencia R1 y R2 a los 18, 23, 28 y 33 días de incubación. Las etapas se clasificaron de acuerdo con los criterios de Miller *et al.* (2017). Las escalas en cada imagen representan 1 cm.

7.7 Temperatura del PST comparado con el segundo tercio de incubación Ene-20

El segundo tercio de los NHD de Ene-20 va desde el día 14 hasta el 30 de incubación. Por otro lado, el PST delimitado por las etapas de desarrollo 23 a 25 va desde los 18 días hasta los 28 días de incubación (Fig. 8 y 9).

Durante el PST se tuvo una temperatura promedio de 30.26 ± 0.11 °C. La diferencia promedio entre la temperatura durante el segundo tercio de incubación y durante el PST es de 0.03 °C (Tabla 5).

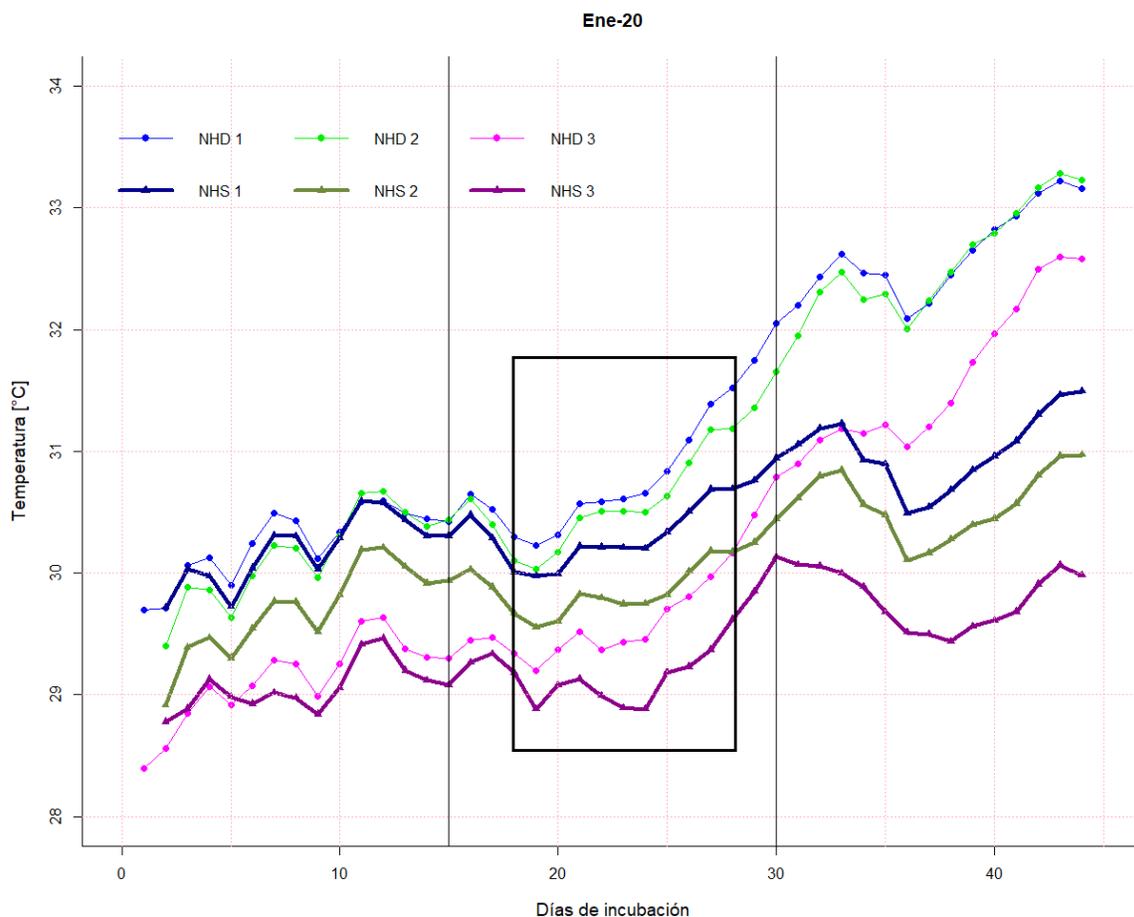


Figura 9. Perfiles de temperatura del experimento **Ene-20**. Se muestran los promedios diarios. Los colores claro representan a los NHD, los mismos colores en su tono oscuro y con una línea gruesa representa su par con huevos simulados (NHS). Las líneas negras verticales dividen el periodo de incubación en tercios. El rectángulo negro delimita el PST según las etapas de desarrollo 23 a 25.

Tabla 5. Temperaturas promedio para cada NHD de **Ene-20** durante el segundo tercio y durante el PST delimitado por las etapas 23, 24 y 25 de desarrollo.

NHD	No. de huevos	Temperatura promedio (ES) [°C]		% de hembras (n = 15)
		2° tercio	PST	
1	74	30.76 (0.12)	30.73 (0.13)	6.6
2	78	30.59 (0.10)	30.56 (0.11)	0
3	72	29.6 (0.09)	29.57 (0.09)	0
Promedio		30.32 (0.09)	30.29 (0.11)	2.2

8. Discusión

8.1 Calor metabólico

Los perfiles del CM en los dos experimentos del presente estudio son similares a los registrados en otras especies de tortugas marinas (Broderick *et al.*, 2001; Godley *et al.*, 2001; Laloë *et al.*, 2014; Önder y Candan, 2016; Zbiden *et al.*, 2006). En general, el CM fue evidente a partir de la segunda mitad del segundo tercio, aumentó en el tercer tercio y ocurrió una ligera disminución algunos días antes de la eclosión. Esta disminución no es estadísticamente significativamente, sin embargo, es observable en los promedios diarios. Estudios en *C. caretta* (Ackerman, 1981) y *D. coriacea* (Wallace *et al.*, 2004) mostraron que al final de la incubación disminuye el consumo de oxígeno (actividad metabólica), atribuido a una breve estivación para sincronizar la eclosión de los embriones, con el fin de sumar esfuerzos y facilitar la emergencia simultánea de las crías en la playa (Broderick *et al.*, 2001; Carr y Hirt, 1961; Doody, 2011; Thompson, 1989).

En el presente estudio, los valores del promedio de CM de los dos experimentos, no aporta información relevante para establecer el papel del CM en la proporción de sexos. Por lo tanto, el análisis de los resultados se centra en los datos obtenidos en el segundo tercio de incubación, generalmente considerado como el PST.

Comparando los resultados de este trabajo (0.38°C para **Oct-16** y 0.51°C para **Ene-20**) con los de otros autores en otras tortugas marinas, tenemos que: son semejantes a los registrados para *C. caretta* (0.2 - 0.5°C) (Godley *et al.*, 2001; Laloë *et al.*, 2014; Zbiden *et al.*, 2006) y *C. mydas* (0.37 - 0.8°C) (Önder y Candan, 2016; Sönmez, 2018), pero son bajos comparados con los valores registrados para *E. imbricata* (1.1°C) (Glen y Mrosovsky, 2004), *C. mydas* (0.68-1.27°C) (Broderick *et al.*, 2001) y *D. coriacea* (0.82 °C) (Godfrey *et al.*, 1997). Si se compara con *N. depressus* podríamos decir que el valor obtenido en este estudio es alto, pues el único dato encontrado para esta especie es de 0.5°C en promedio de toda la incubación (Hewavisenthi y Parmenter, 2002), y con el comportamiento ascendente del CM en otras especies, podemos suponer que durante el segundo tercio de su incubación presentaba temperaturas muy por debajo de 0.5°C. La comparación directa de los presentes resultado es con los datos reportados por Valverde *et al.* (2010), pues se trata de la misma especie, en playas de arribada, pero en latitudes diferentes. Los valores documentados por ellos dan un promedio de 1.76°C para el segundo tercio incubación durante noviembre de 2008, mientras que para enero de 2009 el promedio es 1.26°C, valores muy superiores a los nuestros. Esto podría explicarse por las diferencias de condiciones de los nidos monitoreados, es decir, los valores obtenidos por Valverde *et al.* (2010) provienen de nidos *in situ*, mientras que los de este trabajo son obtenidos de nidos en un corral fuera de la zona de anidación. En playas de anidación masiva es común la sobreposición de nidos y acumulación de materia orgánica de nidos. Se ha visto que una alta densidad de nidos aumenta la temperatura de los nidos incubados dentro de la misma área (Honarvar *et al.*, 2008; Bézy, Valverde y Plante, 2015) y también incrementa la presencia de microorganismos descomponedores y artrópodos que depredan a los huevos, lo que aumenta la temperatura debido a la descomposición de los huevos (Baena *et al.*, 2015; Baena *et al.*, 2020; Madden *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2010).

Tomando en cuenta la propuesta de Mrosovsky e Yntema (1980) en la que, si el CM tiene un valor superior a 1°C durante el PST, se considera biológicamente significativo en la proporción de sexos de las nidadas. Para los valores obtenidos

en este trabajo, el CM no modificó la proporción de sexos, ya que fueron menores a 1°C; sin embargo, para los datos de Valverde *et al.* (2010) en Costa Rica, si hay un efecto. También hay un efecto en *E. imbricata* (Glen y Mrosovsky, 2004) y *C. mydas* (Broderick *et al.*, 2001). En *C. mydas* y en *L. olivacea* ocurre algo similar, pues en el trabajo de Broderick *et al.* (2001) en la Isla Ascensión, hay un efecto en las proporciones sexuales; por su parte, en los trabajos de Sönmez (2018) y Önder y Candan (2016), ambos en Turquía, no lo hay. Esto sugiere que el CM podría tener un efecto en la proporción de sexo, pero solo en algunas playas (con sus factores ambientales y físicos propios) y, por lo tanto, el efecto puede darse o no en especies que ovopositen en una latitud determinada. Sin embargo, es necesario considerar qué criterio se toma para decir que el CM es biológicamente significativo en la proporción de sexos. Algunos lo consideran significativo aun si es menor a 1°C (Önder y Candan, 2016; Sönmez 2018), ya que se basan en modelos de regresión para calcular proporciones sexuales a partir de la temperatura de incubación: la diferencia que hay entre las proporciones sexuales obtenidas considerando el CM y no considerándolo, lo toman como un efecto feminizante. Esto puede considerarse una suposición muy reduccionista, pues no toma en cuenta la complejidad de cada playa ni la distribución del calor en los nidos (Broderick *et al.*, 2001; Godley *et al.*, 1997).

Hay dos RTT documentadas en la literatura para *L. olivacea*: el primero que va de 26 a 33°C (Merchant-Larios *et al.*, 2010); y un segundo más estrecho que va de 29.6 a 31.4°C (Casthologe *et al.*, 2018). El RTT de Merchant-Larios *et al.* (2010) tiene un rango mayor. Sin embargo, no es inválido, pues a 26°C se asegura la determinación de 100% machos en laboratorio, mientras que a 33°C son 100% hembras. Considerando la RTT de Casthologe *et al.* (2018) que va de 29.6 a 31.4°C, así como los aumentos de temperatura (que devienen del CM) sobre los valores de los NHS de cada experimento, tenemos que durante el experimento **Oct-16** los NHD continúan en una TF ($33.79 + 0.38 = 34.17^{\circ}\text{C}$) y por ello que se produzcan 100% hembras. Los de **Ene-20** están por encima de la TM ($29.8 + 0.51 = 30.31^{\circ}\text{C}$), lo que explicaría la presencia de una hembra. De manera que el aporte de temperatura generado por el CM y su efecto sobre la proporción de

sexos no es evidente cuando la temperatura de los NHS (o la arena) se encuentra en los límites del RTT (Broderick *et al.*, 2001). No obstante, su efecto será evidente cuando la temperatura de los NHS se encuentre en los valores intermedios del RTT.

Es importante considerar la heterogeneidad de las condiciones para obtener el valor de referencia al calcular los valores del CM (en este trabajo el de los NHS, en el de la mayoría de los trabajos la temperatura de la arena). Gammon *et al.* (2020) discuten la influencia de la heterogeneidad sobre el cálculo del CM, y sugieren una estandarización en la metodología para el cálculo del CM.

Recomiendan calcularlo como la diferencia entre la temperatura del centro del nido y la temperatura de la arena a 1 m del nido; ambos sensores de temperatura deben ser ubicados a la misma profundidad y paralelos a la línea media de marea. Sin embargo, consideramos que nuestro método es más representativo por respetar la estructura del nido y su distribución del calor, aunque al mismo tiempo es menos práctico al rellenar y colocar pelotas en NHS. Comparar perfiles de temperatura de la arena y de NHS nos daría más información sobre la necesidad de realizar el método que sugerimos, sin embargo, en este trabajo no se tomaron datos de la arena, por lo que la comparación no se realizó.

8.2 Temperaturas según la ubicación de los huevos en el nido: Oct-16

Con el fin de abordar el posible efecto del CM sobre la temperatura de diferentes ubicaciones de los huevos en el nido, se tomaron en cuenta los sensores de temperatura ubicados en las diferentes partes de los nidos.

Hay dos hechos que nos confirman que las diferencias de temperatura entre las ubicaciones dentro nido se deben al CM y no a las cuestiones físicas de la arena o la playa. Primero, los registros del NHS y su ausencia de diferencias significativas en cada uno de los tercios nos dice que en ausencia de CM no hay diferencias entre ubicaciones. Segundo, las diferencias entre el centro y el fondo del nido aumentan conforme avanza el tiempo de incubación, pues esta diferencia es mayor durante el tercer tercio; este comportamiento es propio del CM.

De acuerdo con las temperaturas promedio de cada uno de los nidos durante el primer tercio de incubación, no hubo diferencias significativas entre las diferentes ubicaciones. Durante el primer tercio la cantidad de CM producida por los embriones no es evidente, de manera que la diferencias entre ubicaciones dentro del nido no es distinguible. En cambio, durante el segundo y tercer tercio se observan diferencias. La parte superior y central del nido tuvieron diferencias ligeras, pero no son estadísticamente significativas. Sin embargo, el centro si presentó diferencias con la ubicación inferior del nido. De acuerdo con lo registrado en otras tortugas marinas, se esperaría que el centro tuviera diferencias significativas con ambas ubicaciones (Booth y Astill, 2001; Patiño-Martínez *et al.*, 2011; Wallace *et al.*, 2014). Esto no se cumple en nuestros resultados. La explicación es el NHD 3, que tuvo un comportamiento inusual, ya que su registro superior tuvo temperaturas mayores a las del centro. De manera que, al analizar los rangos de temperatura promedio (prueba Kruskal-Wallis) por ubicación, se traslapan entre sí, lo que da como resultado la ausencia de diferencias significativas.

No se encontraron trabajos con *L. olivacea* que hayan documentado estas diferencias de temperaturas en las diferentes ubicaciones dentro del nido. Así, comparamos nuestros valores con los registrados para nidos de otras tortugas marinas. La diferencia promedio entre el centro y el fondo de nuestros nidos durante el segundo tercio fue de 0.18°C , mientras que para el tercer tercio tuviera una diferencia de 0.41°C . La comparación con trabajos que registran diferencias entre el centro y el fondo del nido durante el segundo tercio de incubación nos dice que los valores de este trabajo son bajos comparados con los registrados para *C. caretta* ($0.4 - 0.9^{\circ}\text{C}$) (Hanson, Wibbels y Martin, 1998), *C. mydas* ($0.3-0.6^{\circ}\text{C}$) (Booth y Astill, 2001) y *D. coriacea* ($0.7 - 0.8^{\circ}\text{C}$) (Patiño-Martínez *et al.*, 2011; Wallace *et al.*, 2004).

Las diferencias entre los valores de las ubicaciones del nido entre especies se pueden explicar por el tamaño y número de huevos de los nidos de cada una (Broderick *et al.*, 2001; van de Merwe, Ibrahim y Whittier, 2006). El número de embriones en desarrollo (biomasa del nido) es importante, pues éstos generarán

calor durante su desarrollo. El tamaño de los embriones también se debe tomar en cuenta, pues aumenta la biomasa del nido (Booth y Astill. 2001). Los huevos en los que no hay embriones en desarrollo no son considerados dentro de la biomasa del nido, ya que no generaran calor, a menos que se encuentren en descomposición (Bézy *et al.*, 2015). Sin embargo, la información acerca del efecto del tamaño o número de huevos sobre la temperatura registrada (o el CM) de cada especie es escasa (Howard *et al.*, 2014).

Las diferencias entre las distintas ubicaciones de los huevos en el nido tienen como consecuencia que dentro del nido haya diferentes regímenes de temperatura y, por lo tanto, de velocidad de desarrollo. Esto podría influir en la proporción del sexo (Hanson *et al.*, 1998, Patiño-Martínez *et al.*, 2011), así como en la eclosión sincronizada (Booth y Astil, 2001), pues los huevos en el fondo del nido se desarrollarán a menor velocidad y a temperaturas más bajas.

8.3 Temperatura de los nidos y su relación con las variaciones climáticas

En el presente estudio, los perfiles de temperatura de los NHD de *L. olivacea*, mostraron un patrón similar a los registrados en otras especies en las que se compararon con los perfiles de la arena (Binckley *et al.*, 1998; Glen y Mrosovsky, 2004; Godley *et al.*, 2001). En general, el patrón de temperatura fue relativamente estable en el primer tercio. A partir del segundo tercio hubo un incremento (atribuible al CM) alcanzando un máximo un día antes de la eclosión, cuando ocurrió un ligero descenso.

La comparación de los dos experimentos realizados en el presente estudio demuestra la importancia que tienen el periodo del año y las condiciones climatológicas sobre la incubación en los nidos de *L. olivacea*. La temperatura promedio en los nidos de **Oct-16** tuvo registros más altos que los de **Ene-20**. Esto tiene una obvia correlación directa con las variaciones en temperatura ambiental existente en las diversas estaciones del año como ha sido registrado en *C. caretta* (Matsuzawa *et al.*, 2002; Mrosovsky, Hopkins-Murphy y Richardson, 1984).

La diferencia en las temperaturas promedio entre el experimento **Oct-16** y **Ene-20** fue de 3.81°C. Los nidos de **Oct-16** llegaron a eclosión en un periodo más corto que los de **Ene-20**, lo que concuerda con lo propuesto por Ackerman (1997) sobre el efecto de la temperatura en la velocidad de desarrollo de los embriones. Este hecho se ha documentado en varias especies de tortugas marinas, tanto en trabajos de laboratorio con temperaturas controladas (Merchant-Larios *et al.*, 1997), como en playas con fluctuaciones diarias de temperatura (Godfrey *et al.*, 1997; Godley *et al.*, 2002; Matsuzawa *et al.*, 2002).

El NHD 3 y el NHS 3 del experimento **Ene-20**, dada su ubicación en el corral, durante la tarde (4 horas aproximadamente) recibían sombreado natural por la vegetación de la playa, de manera que sus registros de temperatura son más bajos que sus pares no sombreados. El sombreado natural representó una diferencia significativa (Tabla 3) en cuanto a la temperatura entre nidos. Sin embargo, no implicó cambios en la proporción de sexos, ya que entre los nidos de **Ene-20** fueron prácticamente todos machos y el nido que mostro una hembra fue el NHD 1. Se esperaría que el sombreado generara cambios en la proporción de sexos como ya se ha sugerido (Esteban *et al.*, 2018; Hill *et al.*, 2015; Vindas-Picado *et al.*, 2020; Wood, Booth, Limpus, 2014), pues disminuyendo la temperatura se generarían más machos. Sin embargo, como ya se mencionó antes, el experimento **Ene-20** se localizó en el límite masculinizante del RTT, y este efecto no fue evidente. Es muy probable que, aumentando el número de experimentos en diversas temporadas del año, aumenten las diferencias de temperatura entre experimentos e incluso entre nidos, ya sea por sombreado natural u otros factores intrínsecos de la playa o el ambiente y, con ello, es posible que influya directamente en la proporción de sexos.

Las temperaturas durante el segundo tercio de incubación son 34.17°C para **Oct-16** y 30.32°C para **Ene-20**. Considerando la TP (en un rango de 30-30.7°C; Casthologe *et al.*, 2018; McCoy *et al.*, 1983; Wibbels *et al.*, 1998) para *L. olivacea*, se esperaría que los nidos **Oct-16** fueran en su totalidad hembras, mientras que los de **Ene-20** tuvieran una proporción de sexos cercana a 1:1. El primer caso se cumple. Sin embargo, el segundo caso no, pues en esos nidos fueron

prácticamente todos machos (2.2% de hembras). Esto deja entrever que las TP obtenidas en el laboratorio representan una simplificación con respecto a las condiciones existentes en los nidos naturales, y que podrían diferir entre poblaciones de la misma especie.

Los estudios donde se busca la TP de laboratorio de las diferentes especies de tortuga marina, generalmente utilizan una cantidad reducida de huevos (10-40 huevos) en incubadoras con temperaturas estables (Casthologe *et al.*, 2018; Godfrey *et al.*, 1999; Godfrey y Mrosovsky, 2006). Esto no sucede en las condiciones naturales de un nido, pues tienen un número mayor de huevos, que varía de acuerdo con la especie y nido (Miller, 1997) y fluctuaciones de temperatura diarias. Otro factor importante es la temperatura experimentada por los huevos, pues en nidos naturales la distribución interna del calor es compleja e irregular, y no regular como lo sería en las cajas plásticas que se utilizan en las incubadoras. De esta manera, los resultados de proporciones sexuales de estos experimentos están sesgados por el reducido número de embriones que lleguen a eclosionar (Godfrey *et al.*, 1999; Godfrey y Mrosovsky, 2006; Reinhold *et al.*, 2017; Wibbels *et al.*, 1998). Esto dificulta la extrapolación acrítica de la TP obtenida en el laboratorio a los nidos naturales. Sin embargo, la TP debe ser entendida como un concepto teórico de utilidad matemática en la estimación de sesgos en la proporción de sexos y ampliamente utilizada en la elaboración de modelos predictivos (Godfrey y Mrosovsky, 2006; Mrosovky y Pieau, 1991).

8.4 Importancia de la latitud (playas) en el estudio de la temperatura de los nidos

En este estudio, intentamos imitar la morfología de los NHD suplantando los huevos con pelotas llenadas con agua con un diámetro similar a los huevos naturales, de manera que asumimos que la variación de las temperaturas registradas en los NHS no tiene influencia derivada del CM generada por los embriones en desarrollo. Las diferencias cuantitativas en los perfiles de temperatura de los NHD, depende tanto de factores externos como internos. Como interno tenemos al CM (van de Merwe *et al.*, 2006). Entre los externos están los factores físicos y ambientales como: la temperatura superficial del aire

(Montero *et al.*, 2018; Santiadrían-Tomillo *et al.*, 2012; Santiadrían-Tomillo *et al.*, 2015), la temperatura superficial del mar (Girondot y Kaska, 2015), el tamaño de grano (Marco *et al.*, 2017; Mortimer, 1990), color (Hays *et al.*, 2001; Laloë *et al.*, 2014) y humedad de la arena (Montero *et al.*, 2018; Sifuentes-Romero *et al.*, 2018), mismos que determinan la conducción de la energía en forma de calor proveniente del sol hacia los huevos en los nidos (Sandoval *et al.*, 2011). Este hecho muestra la importancia de tomar en cuenta la diversidad de playas con sus factores físicos particulares a la hora plantear modelos de predicción de temperatura en los nidos. Así mismo, es necesario tener registro del mayor número de playas posibles, con el fin de fortalecer los modelos teóricos existentes con un mayor número de datos fundamentados con resultados empíricos.

Las diferencias de temperatura entre los datos de Valverde *et al.*, (2010) y los nuestros deben explicarse por las diferencias de latitud y por las condiciones ambientales durante los años y meses que se realizaron, pues sus controles (temperatura de la arena) muestran temperaturas superiores a los nuestros (temperatura de los NHS). Sin embargo, nosotros no tomamos datos ambientales que permitan comparar. Finalmente, como ya se mencionó anteriormente, las temperaturas del trabajo citado provienen de nidos *in situ*, lo que tiene implicaciones en los registros de temperatura.

8.5 Etapas de desarrollo en los nidos de referencia Ene-20: implicaciones en el PST

El empleo de los nidos de referencia en el presente trabajo tuvo como objetivo conocer las etapas del desarrollo embrionario en las que se encuentran los nidos incubados simultáneamente. Como el muestreo requiere abrir el nido y exponerlo brevemente a la temperatura ambiente, consideramos la posibilidad de que sus perfiles de temperatura se vieran afectados. Así, se excluyó el muestreo para los NHD de **Ene-20** y solo se tomaron embriones de los nidos R1 y R2.

Dada la falta de diferencias significativas en los datos de temperatura, las etapas registradas en el nido R1 pueden extrapolarse a los NHD 1, 2 y 3. Llama la atención que a pesar de que el nido R1 tuvo diferencias en el patrón de

temperatura con el NHD 3 (Fig. 5), no mostró diferencias significativas (Tabla 3). Sin embargo, los nidos NHD 1 y 2 comparados con el NHD 3, si mostraron diferencias (Tabla 3), lo por que no parece valido asumir que las etapas registradas en el R1 y en los NHD 1 y 2 sean las mismas a NHD 3. Sin embargo, el nido R2 no tuvo diferencias significativas con el NHD 3, quedando como su referente de etapas.

A pesar de las diferencias significativas entre los nidos R1 y R2 (Tabla 3), los embriones de ambos nidos mostraron el mismo patrón de etapas de desarrollo. Lo que sugiere que, las diferencias de temperatura de esta magnitud (0.5°C) no modifican drásticamente las etapas de desarrollo. Así, consideramos que es válido asumir que los embriones de los nidos R1 y R2 y los de los NHD 1, 2 y 3 se encuentran en las mismas etapas críticas cuando ocurre la determinación sexual.

Como se ha mencionado, en la literatura generalmente los análisis se enfocan en la temperatura promedio de incubación del segundo tercio de la incubación total, pues dentro de este periodo se encuentra el PST. Sin embargo, estudios en *L. olivacea* indican que tal afirmación es sólo parcialmente válida y puede resultar imprecisa (Hernández-Romero, 2018; Merchant-Larios *et al.*, 2021). Durante el desarrollo embrionario, la DST ocurre a nivel de la gónada bipotencial. Los genes Sox9 (*SRY box 9*), Dmrt1 (*Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) y Foxl2 (*Forkhead box L2*) todos factores de transcripción se han visto involucrados en el establecimiento de la gónada bipotencial, en la determinación y diferenciación del sexo en especies con DST. Sox9 principalmente se encuentra implicado en el establecimiento de la gónada bipotencial, pero también importante en la determinación y diferenciación de testículos igual que Dmrt1, mientras que Foxl2 es importante en la determinación y diferenciación de ovarios (Díaz-Hernández *et al.* 2012; Ge *et al.* 2017; Rhen *et al.* 2007; Shoemaker *et al.* 2007; Torres-Maldonado *et al.* 2002). Las redes de expresión genética involucradas se establecen entre las etapas 23, 24, 25 y 26. Brevemente: los genes Sox9, Dmrt1 se expresan gradualmente durante las etapas 23 y 24 tanto a TF (33°C) como TM (26°C), mientras que Foxl2 se expresa en la etapa 24 a TM y TF. Sin embargo, a TF, en la etapa 25, la expresión de Sox9 y Dmrt1 disminuyen y Foxl2 se

incrementa; en contraste, a TM Sox9 y Dmrt1 aumentan y Foxl2 disminuye. Las diferencias cuantitativas en la expresión de los tres genes termo-dependientes se acentúan en la etapa 25. Finalmente, la diferenciación histológica de la gónada como ovario o testículo es evidente en la etapa 26. En la etapa 26 a TF, Foxl2 permanece expresándose en las células de la corteza ovárica y los cordones medulares fragmentados en tanto que, el Sox9 y el Dmrt1 desaparecen junto con la remodelación de los cordones medulares. Por otro lado, en los testículos Sox9 y Dmrt1 continúan expresándose en los cordones seminíferos y Foxl2 desaparece (Díaz-Hernández *et al.*, 2020).

Experimentos de intercambio de TF a TM e inversamente, mostraron que alrededor del 95% de los embriones en la etapa 26 no responde al cambio de temperatura, diferenciando ovarios o testículos al ser cambiados a TM y TF, respectivamente. Es decir, el sexo ya está determinado en la etapa 26. En contraste, en las etapas 23 y 24 todos los embriones responden diferenciando sus gónadas de acuerdo con la TF o TM de cambio, formando ovarios o testículos, respectivamente. La etapa 25 puede considerarse de transición ya que un número variable de embriones responde al intercambio (Cruz-Alcántara, 2019; Merchant-Larios *et al.*, 1997).

Así, podemos delimitar, a partir de muestreos, el intervalo de días (alrededor de 7 días; Merchant-Larios *et al.* 2021) en el que los embriones se encuentran en las etapas críticas de la determinación del sexo y tener un PST más preciso. Esto podría resultar útil en el planteamiento de modelos de predicción de temperatura del nido y por lo tanto del sexo de éstos. La idea de tomar en cuenta a las etapas de desarrollo para delimitar un PST más preciso también es comentada por Abreu-Grobois *et al.* (2020), quienes toman criterios morfológicos del desarrollo, considerando desde la etapa 21, cuando la cresta genital se desarrolla, hasta la etapa 26 cuando la gónada ya se diferenció. Sin embargo, no mencionan redes de expresión y regulación génica. Merchant-Larios *et al.* (2021) también comentan esta idea con fundamento en las redes de regulación y expresión de genes.

8.6 Temperatura durante el PST de Ene-20

La temperatura promedio durante el PST, esta no fue distinta a la del segundo tercio de incubación, esto se debe a que a lo largo del periodo de incubación del experimento **Ene-20** no hubo cambios bruscos de temperatura, de manera que, en este caso, el perfil de temperatura de los nidos fue regular, es decir, con un comportamiento ascendente durante toda la incubación (Fig. 9).

El patrón de temperatura se puede ver alterado si ocurre un fenómeno meteorológico que cambie las condiciones ambientales drásticamente, como la lluvia moderada (Valverde *et al.*, 2010) o intensa ((Staines *et al.*, 2020), como en los huracanes (Wallace *et al.*, 2004) que, al disminuir la temperatura de la arena, disminuye la temperatura de los nidos.

Un cambio importante en la temperatura en los NHD tendrá consecuencias distintas según en qué momento de la incubación ocurra. Si ocurre durante el primer tercio modificará la velocidad de desarrollo de los embriones (periodo requerido para pasar de una etapa a la siguiente) cambiando la posición del PST, independientemente del promedio de temperatura registrado durante todo el periodo de incubación. Esta afirmación se basa en el hecho de que las gónadas embrionarias se establecen precisamente durante la primera mitad del segundo tercio, y es en las gónadas donde la temperatura determina el sexo de los embriones (Moreno-Mendoza, Harley y Merchant-Larios, 2001). Finalmente, si el cambio brusco ocurre durante el segundo tercio, su efecto dependerá de la etapa de desarrollo en que ocurra. Si es durante las etapas 23 y 25, que en este caso fue en un periodo de 10 días, la proporción de sexos variará y será independiente del promedio de la temperatura registrada durante el segundo tercio (alrededor de 15 días aproximadamente).

9. Conclusiones

1. Durante el segundo tercio de incubación, la temperatura promedio de los nidos NHD y NHS en el experimento de **Oct-16** fue de 34.17°C y 33.79°C, respectivamente. Por otra parte, la temperatura promedio de los NHD y NHS en el experimento de **Ene-20** fue de 30.32°C y 29.80°C, respectivamente.
2. Los resultados muestran que, el promedio de temperatura del experimento **Oct-16** resulto en un 100% hembras, en contraste con el 2.2% de hembras de **Ene-20**. El CM durante el segundo tercio de incubación fue de 0.38°C y 0.52°C, respectivamente. Los actuales resultados sugieren que el aumento de temperatura dado por el CM no influye significativamente sobre la proporción de sexos cuando el promedio de temperatura de los NHS se ubica en los límites del RTT. Sin embargo, es probable que afecte la proporción de sexos cuando la temperatura promedio del segundo tercio de incubación se encuentre en los valores intermedios del RTT.
3. Los presentes resultados son preliminares. Su validación requiere del monitoreo de un mayor número de nidos en diversas condiciones climatológicas.

10. Bibliografía

- Abreu-Grobois F., A., Morales-Mérida, B., A., Hart, C., E., Guillon, J., Godfrey, M., H., Navarro, E., Girondot, M. (2020). Recent advances on the estimation of the thermal reaction norm for sex ratios. *PeerJ*, 8, e8451.
- Ackerman, R. A. (1981). Oxygen consumption by sea turtle (*Chelonia, Caretta*) eggs during development. *Physiological Zoology*, 54(3), 316–324.
- Ackerman, R. A. (1997). The nest environment and the embryonic development of sea turtles. En Lutz, P. L., Musick, J. A. (eds). *The Biology of Sea Turtles* (pp. 83–106). CRC Press, Boca Raton.
- Allen, M. R., Dube, O., Solecki, W., Aragón-Durand, F., Cramer, W., Humphreys, S., Kainuma, M., Kala, J., Mahowald, N., Mulugetta, Y., Perez, R., Wairiu, M., Zickfeld, K. (2018): Framing and Context. En: Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H-O., Roberts, D., Skea, J., Shukla, P., Pirani, A., Moufouma-Okia, W., Péan, C., Pidcock, R., Connors, S., Matthews, J., Chen, Y., Zhou, X., Gomis, M., Lonnoy, E., Maycock, T., Tignor, M., Waterfield T. (editores), *Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty* (pp. 32). Ginebra, Suiza: World Meteorological Organization.
- Baena, M. L., Crespo, C. H., Carrillo, M. S., Escobar, F. (2020). Spatiotemporal variation in *Lepidochelys olivacea* sea turtle nests and their influence on the abundance and reproductive phenology of the sapro-necrophagous beetle *Omorgus suberosus*. *The Science of Nature*, 107(6).
- Baena, M. L., Escobar, F., Halffter, G., García-Chávez, J. H. (2015). Distribution and feeding behavior of *Omorgus suberosus* (Coleoptera: Trogidae) in *Lepidochelys olivacea* turtle nests. *PloS One*, 10(9), e0139538.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W. Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 15, 365-377.

- Bézy, V. S., Valverde, R. A., Plante, C. J. (2015). Olive ridley sea turtle hatching success as a function of the microbial abundance in nest sand at Ostional, Costa Rica. *PLoS one*, 10(2), e0118579.
- Binckley, C. A., Spotila, J. R., Wilson, K. S., Paladino, F. V. (1998). Sex determination and sex ratios of pacific leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*. *Copeia*, 1998(2), 291-300.
- Booth, D. T., Astill, K. (2001) Temperature variation within and between nests of the green sea turtle, *Chelonia mydas* (Chelonia: Cheloniidae) on Heron Island, Great Barrier Reef. *Australian Journal of Zoology*, 49, 71-84.
- Broderick, A. C., Godley, B. J., Hays, G. C. (2001). Metabolic heating and the prediction of sex ratios for green turtles (*Chelonia mydas*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 74(2), 161–170.
- Bull, J. J. (1980). Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology*, 55(1), 3-21.
- Bull, J. J., Vogt, R. (1981). Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. *Journal of Experimental Zoology*, 218(3), 435–440.
- Carr, A., Hirth, H. (1961). Social facilitation in green turtle siblings. *Animal Behaviour*. 9, 68-70.
- Casthologe, V., D., Dos Santos, M., Castilhos, J., C. de Filho, P., R., J., Gomes, L., Clemente-Carvalho, R., Ferreira, P. (2018). Pivotal temperature and hatchling sex ratio of olive ridley sea turtles *Lepidochelys olivacea* from the south Atlantic Coast of Brazil. *Herpetological Conservation and Biology*, 13(2), 488-496.
- Chiari, Y., Cahais, V., Galtier, N., Delsuc F. (2012). Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BioMed Central Biology*, 10, 65.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Secretaría del Medio Ambiente, Energía y Desarrollo Sustentables (SEMAEDES). (2018). *Estrategia para la conservación y el uso sustentable de la biodiversidad del estado de Oaxaca* (1° ed.). CONABIO,

México. pp. 46-49.

<http://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium/Documentos/15091.pdf>

Coria-Monter E. Durán-Campos. E. (2017). The relationship between the massive nesting of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) and the local physical environment at La Escobilla, Oaxaca, Mexico, during 2005.

Hidrobiológica, 27(2), 201-209.

Crawford, N. G., Parham, J. F., Sellas, A. B., Faircloth, B. C., Glenn, T. C., Papenfuss, T. J., Henderson, J. B., Hansen, M. H., Simison, B., W. (2015). A phylogenomic analysis of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 250–257.

Dalrymple, G. H., Hampp, J. C., Wellins, D. J. (1985). Male-biased sex ratio in a cold nest of a hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Journal of Herpetology*, 19(1), 158-159.

Deeming, D. C. (2004). *Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour*. Nottingham: Nottingham University Press.

Díaz-Hernández, V., Domínguez-Mora, P., Chino-Palomo, L., Marmolejo-Valencia, A., Harfush, M., Merchant-Larios, H. (2020). Spatiotemporal expression of Foxl2 and Dmrt1 before, during, and after sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Sexual Development*, 13, 286–296.

Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A., Harfush, M., Merchant-Larios, H. (2012). Formation of the genital ridges is preceded by a domain of ectopic Sox9-expressing cells in *Lepidochelys olivacea*. *Developmental Biology*, 361(1), 156–166.

Dirección de Especies Prioritarias para la Conservación (DEPC). (2008, 14 de agosto). *CPCTM Morro Ayuta*. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

<http://www.conanp.gob.mx/conanp/dominios/especies/tortugas/sitio/morro.php>

d-maps.com. (2022). *Mapa Oaxaca (México)*. Gap, Francia: d-maps. https://d-maps.com/carte.php?num_car=28408

- Doody, J. S. (2011). Environmentally cued hatching in reptiles, *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 49–61.
- Dornfeld, T., Robinson, N., Tomillo, P., Paladino, F. (2015). Ecology of solitary nesting olive ridley sea turtles at Playa Grande, Costa Rica. *Marine Biology*, 162, 123–139.
- Drake, D. L., Spotila, J. R. (2002). Thermal tolerances and the timing of sea turtle hatchling emergence. *Journal of Thermal Biology*, 27(1), 71–81.
- Esteban, N., Laloë, J.-O., Mortimer, J., Guzman, A., Hays, G. C. (2016). Male hatchling production in sea turtles from one of the world's largest marine protected areas, the Chagos Archipelago. *Scientific Reports*, 6, 20339.
- Esteban, N., Laloë, J., O., Kiggen, F., S., Ubels, S., M., Becking, L., E., Meesters, E., H., Berkel, J., Hays, G., C., Christianen, M., J. (2018). Optimism for mitigation of climate warming impacts for sea turtles through nest shading and relocation. *Scientific Reports* 8, 17625.
- Ferguson, M. W., Joanen, T. (1982). Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. *Nature*, 296(5860), 850–853.
- Fisher, L. R., Godfrey, M. H., Owens, D. W. (2014). Incubation temperature effects on hatchling performance in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *PloS One*, 9(12), e114880.
- Fuentes, M. M., Hamann, M., Limpus, C. J. (2010). Past, current and future thermal profiles of green turtle nesting grounds: Implications from climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 383(1), 56–64.
- Fuentes, M. M., Porter, W. P. (2013). Using a microclimate model to evaluate impacts of climate change on sea turtles. *Ecological Modelling*, 251, 150–157.
- Gammon, M., Fossette, S., McGrath, G., Mitchell, N. (2020). A systematic review of metabolic heat in sea turtle nests and methods to model its impact on hatching success. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 556379
- García–Grajales, J., Meraz Hernando, J. F., Arcos García, J. L., Ramírez Fuentes, E. (2019). Incubation temperatures, sex ratio and hatching success of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in two protected hatcheries on

- the central Mexican coast of the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Animal Biodiversity and Conservation*, 42(1), 143–152.
- Girondot, M., Kaska, Y. (2015). Nest temperatures in a loggerhead nesting beach in Turkey is more determined by sea surface than air temperature. *Journal of Thermal Biology*, 47, 13–18.
- Glen, F., Mrosovsky, N. (2004). Antigua revisited: the impact of climate change on sand and nest temperatures at a hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting beach. *Global Change Biology*, 10(12), 2036–2045.
- Godfrey, M. H., Barreto, R., Mrosovsky, N. (1997). Metabolically generated heat of developing eggs and its potential effect on sex ratio of sea turtle hatchlings. *Journal of Herpetology*, 31(4), 616-619.
- Godfrey, M., D'Amato, A.F., Marcovaldi, M., Mrosovsky, N. (1999). Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 77, 1465-1473.
- Godfrey, M., Mrosovsky, N. (2006). Pivotal temperature for green sea turtles, *Chelonia mydas*, nesting in Suriname. *The Herpetological Journal*, 16. 55-61.
- Godley, B., Broderick, A. C., Downie, J., Glen, F., Houghton, J. D., Kirkwood, I., Recce, S., Hays, G. C. (2001). Thermal conditions in nests of loggerhead turtles: further evidence suggesting female skewed sex ratios of hatchling production in the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 263(1), 45–63.
- Godley, B.J., Broderick, A.C., Glen, F., Hays, G.C. (2002). Temperature-dependent sex determination of Ascension Island green turtles, *Marine Ecology Progress Series*, 226, 115-124.
- Graves, M., J., A. (2008). Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annual Review of Genetics*, 42, 565–586.
- Graves, M., J., A., Peichel, C., L. (2010). Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? *Genome Biology*, 11(4), 205.

- Griffiths, R. (2000). Sex identification in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 9(1), 14–26.
- Guillon, J., Guéry, L., Hulin, V., Girondot, M. (2012). A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contributions to Zoology*, 81(3), 147–158.
- Hawkes, L. A., Broderick, A. C., Godfrey, M. H., Godley, B. J. (2007). Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology*, 13(5), 923–932.
- Hanson, J., Wibbels, T., Martin, R. E. (1998). Predicted female bias in sex ratios of hatchling loggerhead sea turtles from a Florida nesting beach. *Canadian Journal of Zoology*, 76(10), 1850–1861.
- Hays, G. C., Ashworth, J. S., Barnsley, M. J., Broderick, A. C., Emery, D. R., Godley, B. J., Henwood, A., Jones, E. L. (2001). The importance of sand albedo for the thermal conditions on sea turtle nesting beaches. *Oikos*, 93(1), 87–94.
- Hays, G. C., Mazaris, A. D., Schofield, G. (2014). Different male vs. female breeding periodicity helps mitigate offspring sex ratio skews in sea turtles. *Frontiers in Marine Science*. 1(43), 1–9.
- Hendrickson, J. R. (1958). The green sea turtle, *Chelonia mydas* (Linn.) in Malaya and Sarawak. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 130(4), 455–535.
- Hernández-Romero, A. (2018). Correlación de la temperatura de incubación, la expresión de SOX9 y la proporción de sexos en nidos de la tortuga *Lepidochelys olivacea*. [tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
<http://132.248.9.195/ptd2018/abril/0773549/Index.html>
- Hill, J., E., Paladino, F., V., Spotila, J., R., Santiadrían-Tomillo, P. (2015). Shading and watering as a tool to mitigate the impacts of climate change in sea turtle nests. *PloS One*, 10(6), e0129528.
- Hirth, H. (1980). Some Aspects of the Nesting Behavior and Reproductive Biology of Sea Turtles, *American Zoologist*, 20(3), 507–523.

- Holleley, C. E., O'Meally, D., Sarre, S., Marshall Graves, J. A., Ezaz, T., Matsubara, K., Bhumika, A., Zhang, W., Georges, A. (2015). Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature*, 523(7558), 79–82.
- Honarvar, S., O'Connor, M. P., Spotila, J. R. (2008). Density-dependent effects on hatching success of the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*. *Oecologia*, 157(2), 221–230.
- Howard, R., Bell, I., Pike, D. A. (2014) Thermal tolerances of sea turtle embryos: current understanding and future directions. *Endangered Species Research*, 26, 75-86.
- Howard, R., Bell, I., Pike, D. A. (2015). Tropical flatback turtle (*Natator depressus*) embryos are resilient to the heat of climate change. *Journal of Experimental Biology*, 218, 3330-3335.
- Huang, S., Ye, L., Chen, H. (2017). Sex determination and maintenance: the role of Dmrt1 and Foxl2. *Asian Journal of Andrology*, 19(6), 619–624.
- IPCC. (2014). *Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático* [Equipo principal de redacción, Pachauri, R., Meyer, L. (editores)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 157 pp.
- IPCC. (2019a): Annex I: glossary [van Diemen, R. (editor)]. En: Shukla, P., Skea, J., Calvo, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H-O., Roberts, D., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., van Diemen, R., Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Neogi, S., Pathak, M., Petzold, J., Portugal Pereira, J., Vyas, P., Huntley, E., Kissick, K., Belkacemi, M., Malley, J. (editores). *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*. Ginebra, Suiza: IPCC.
- IPCC. (2019b). Summary for policymakers. En: Shukla, P., Skea, J., Calvo, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H-O., Roberts, D., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., van Diemen, R., Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Neogi, S.,

- Pathak, M., Petzold, J., Portugal Pereira, J., Vyas, P., Huntley, E., Kissick, K., Belkacemi, M., Malley, J. (editores). *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*. Ginebra, Suiza: IPCC.
- IUCN. (2020). *The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2020-2*.
<https://www.iucnredlist.org/search?query=Marine%20Turtles&searchType=species>
- Janzen F. (1994). Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7487–7490.
- Jensen, M. P., Allen, C. D., Eguchi, T., Bell, I., LaCasella, E. L., Hilton, W. A., Hof, C. A., Dutton, P. H. (2018). Environmental Warming and Feminization of One of the Largest Sea Turtle Populations in the World. *Current Biology*, 28(1), 154–159.
- Jia, G. E., Shevliakova, E., Artaxo, P., De Noblet-Ducoudré, N., Houghton, R., House, J., Kitajima, K., Lennard, C., Popp, A. Sirin, A., Sukumar, R., Verchot, L. (2019): Land–climate interactions. En: Shukla, P., Skea, J., Calvo, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H-O., Roberts, D., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., van Diemen, R., Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Neogi, S., Pathak, M., Petzold, J., Portugal Pereira, J., Vyas, P., Huntley, E., Kissick, K., Belkacemi, M., Malley, J. (editores). *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*. Ginebra, Suiza: IPCC.
- Kawagoshi, T., Nishida, C., Matsuda, Y. (2012). The origin and differentiation process of X and Y chromosomes of the black marsh turtle (*Siebenrockiella crassicollis*, Geoemydidae, Testudines). *Chromosome Research*, 20(1), 95–110.
- Kawagoshi, T., Uno, Y., Matsubara, K., Matsuda, Y., Nishida, C. (2009) The ZW micro-sex chromosomes of the chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus*

- sinensis*, Trionychidae, Testudines) have the same origin as chicken chromosome 15. *Cytogenetic and Genome Research*, 125(2), 125-131.
- Kawagoshi, T., Uno, Y., Nishida, C., Matsuda, Y. (2014). The Staurotypus turtles and aves share the same origin of sex chromosomes but evolved different types of heterogametic sex determination. *PloS one*, 9(8), e105315.
- Kawai, A., Ishijima, J., Nishida, C. Kosaka, A., Ota, H., Kohno, S., Matsuda, Y. (2009). The ZW sex chromosomes of *Gekko hokouensis* (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species. *Chromosoma*, 118(1), 43-51.
- Kettlewell, J. R., Raymond, C. S., Zarkower, D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis*, 26(3), 174-178.
- Lacetera, N. (2019). Impact of climate change on animal health and welfare. *Animal Frontiers*, 9(1), 26-31.
- Laloë, J.-O., Cozens, J., Renom, B., Taxonera, A., Hays, G. C. (2014). Effects of rising temperature on the viability of an important sea turtle rookery. *Nature Climate Change*, 4(6), 513–518.
- Laloë, J.-O., Esteban, N., Berkel, J., Hays, G. C. (2016). Sand temperatures for nesting sea turtles in the Caribbean: Implications for hatchling sex ratios in the face of climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474, 92–99.
- Laloë, J.-O., Cozens, J., Renom, B., Taxonera, A., Hays, G. C. (2017). Climate change and temperature-linked hatchling mortality at a globally important sea turtle nesting site. *Global Change Biology*. 23(11), 4922– 4931.
- Lang, J. W., Andrews, H. V. (1994). Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology*, 270, 28–44.
- 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. *Endangered Species Research*, 19, 123-128.

- Leemans, R., Eickhout, B. (2004). Another reason for concern: regional and global impacts on ecosystems for different levels of climate change. *Global Environmental Change*, 14(3), 219–228.
- Li, Y., Cohen, J. M., Rohr, J. R. (2013). Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology*, 8(2), 145–161.
- Madden, D., Ballesteros, J., Calvo, C., Carlson, R., Christians, E., Madden, E. (2008). Sea turtle nesting as a process influencing a sandy beach ecosystem. *Biotropica*, 40(6), 758–765.
- Maloney, J. E., Darian-Smith, C., Takahashi, Y., Limpus, C. J. (1990). The environment for development of the embryonic loggerhead turtle (*Caretta caretta*) in Queensland. *Copeia*, 1990(2), 378-387.
- Marco, A., Abella-Perez, E., Tiwari, M. (2017). Vulnerability of loggerhead turtle eggs to the presence of clay and silt on nesting beaches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 486, 195–203.
- Marcovaldi, M., López-Mendilaharsu, M., Santos, A. S., Lopez, G. G, Godfrey, M. H., Tognin, F., Baptistotte, C., Thome, J. C., Dias, A. C., Castilhos, J., Fuentes, M. M. (2016). Identification of loggerhead male producing beaches in the south Atlantic: Implications for conservation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 477, 14–22.
- Matsubara, K., Kumazawa, Y., Ota, H., Nishida, C., Matsuda, Y. (2019). Karyotype analysis of four blind snake species (Reptilia: Squamata: Scolecophidia) and karyotypic changes in serpentes. *Cytogenetic and Genome Research*, 157, 98-106.
- Matsuzawa, Y., Sato, K., Sakamoto, W., Bjorndal, K., A. (2002). Seasonal fluctuations in sand temperature: effects on the incubation period and mortality of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) pre-emergent hatchlings in Minabe, Japan. *Marine Biology*, 140(3), 639–646.
- Maulany, R. I., Booth, D. T., Baxter, G. S. (2012a). Emergence success and sex ratio of natural and relocated nests of olive ridley turtles from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia. *Copeia*, 2012(4), 738-747,

- Maulany, R. I., Booth, D. T., Baxter, G. S. (2012b). The effect of incubation temperature on hatchling quality in the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia: implications for hatchery management. *Marine Biology* 159, 2651–2661.
- Maxwell, J., A., Motara, M., A., Frank, G., H. (1988) A micro-environmental study of the effect of temperature on the sex ratios of the loggerhead turtle, *Caretta caretta*, from Tongaland, Natal, South African. *Journal of Zoology*, 23(4), 342-350.
- McCoy, C. J., Vogt, R. C., Censky, E. J. (1983). Temperature-controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetology*, 17(4), 404-406.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., Cortez, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms underlying temperature-dependent sex determination in turtles. *Sexual Development*, 15(1-3), 38–46.
- 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, 50-61.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramirez, S., Moreno-Mendoza, N., Marmolejo-Valencia, A. (1997). Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 107(3), 373–385.
- Merchant-Larios, H., Villalpando-Fierro, I., Centeno-Urruiza, B. (1989). Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs*, 3, 43-61.
- Miller, J. D. (1997). Reproduction in sea turtles. En: Lutz, P., L. Musick, J., A. (Eds.). *The Biology of Sea Turtles*. Boca Raton, Florida: CRC Press. pp 51-79.
- Miller, J. D., Mortimer, J. A., Limpus, C. L. (2017). A field key to the developmental stages of marine turtles (Cheloniidae) with notes on the development of *Dermochelys*. *Chelonian Conservation and Biology*, 16(2), 111-122.

- Montero, N., Ceriani, S. A., Graham, K., Fuentes, M. M. (2018). Influences of the local climate on loggerhead hatchling production in north Florida: implications from climate change. *Frontiers in Marine Science*, 5(262).
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V., R., Merchant-Larios, H. (2001). Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Developmental Biology*, 229(2), 319-326.
- Morreale, S. J., Ruiz, G. J., Spotila, J. R., Standora, E. A. (1982). Temperature-dependent sex determination: current practices threaten conservation of sea turtles. *Science*, 216(4551), 1245–1247.
- Mortimer, J. (1990). The influence of beach sand characteristics on the nesting behavior and clutch survival of green turtles (*Chelonia mydas*). *Copeia*, 1990(3), 802-817.
- Mrosovsky, N. (1994). Sex ratios of sea turtles. *Journal Experimental Zoology*, 270, 16-27.
- Mrosovsky, N., Hopkins-Murphy, S. R., Richardson, J. I. (1984). Sex ratio of sea turtles: seasonal changes. *Science*, 225(4663), 739–741.
- Mrosovsky, N., Provancha, J. (1992). Sex ratio of hatchling loggerhead sea turtles: data and estimates from a 5-year study. *Canadian Journal of Zoology*, 70(3), 530–538.
- Mrosovsky, N., Pieau, C. (1991). Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*, 12(2), 169–179.
- Mrosovsky, N., Yntema, C. (1980). Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation practices. *Biological Conservation*, 18(4), 271–280.
- Murdock, C., Wibbels T. (2003). Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenetic and Genome Research*, 101, 302–308

- Murdock, C., Wibbels, T. (2006), Dmrt1 expression in response to estrogen treatment in a reptile with temperature-dependent sex determination. *Journal Experimental Zoology*, 306B(2), 134-139.
- Önder, B., Candan, O. (2016) The feminizing effect of metabolic heating in green turtle (*Chelonia mydas*) clutches in the eastern Mediterranean. *Zoology in the Middle East*, 62(3), 239-246.
- Öz, M., Erdoğan, A., Kaska, Y., Düşen, S., Aslan, A., Sert, H., Yavuz, M., Tunç, R. (2004). Nest temperatures and sex-ratio estimates of loggerhead turtles at Patara beach on the southwestern coast of Turkey. *Canadian Journal of Zoology*, 82(1), 94–101.
- Patiño-Martinez, J., Marco, A., Quiñones, L., Hawkes, L. (2011). A potential tool to mitigate the impacts of climate change to the caribbean leatherback sea turtle. *Global Change Biology*, 18(2), 401–411.
- Pendoley, K. L., Bell, C. D., McCracken, R., Ball, K. R., Sherborne, J., Oates, J. E., Becker, P., Vitenbergs, A., Whittock, P. A. (2014). Reproductive biology of the flatback turtle *Natator depressus* in Western Australia. *Endangered Species Research*, 23, 115-123.
- Peralta, E., Luna, T. (2016). Tortuga Golfina. En Gaona, O., Barragán, A. (Coord.) *Las tortugas marinas en México: logros y perspectivas para su conservación* (p.83). Ciudad de México, México: ITZENI
- Pieau, C., Dorizzi, M. (1981). Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in embryos of the turtle, *Emys orbicularis*. *Journal of Morphology*, 170(3), 373–382.
- Pieau, C., Girondot, M., Richard-Mercier, N., Desvages, G., Dorizzi, M., Zaborski, P. (1994). Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: Hormonal involvement. *Journal of Experimental Zoology*, 270(1), 86–94.
- Pritchard, P., Mortimer, J. (1999) Taxonomy, External Morphology, and Species Identification. En: Eckert, K., Bjørndal, K., Abreu-Grobois, F., Donnelly, M. (editores). *Research and Management Techniques for the Conservation of*

- Sea Turtles* (pp. 21-38). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.
- Raj, U. (1976). Incubation and hatching success in artificially incubated eggs of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 22, pp. 91-99.
- Reinhold, L., Limpus, C.J., Limpus, D.J., Whiting, A.U. (2017). Pivotal temperature of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from Dirk Hartog Island, Western Australia. *Memoirs of the Queensland Museum-Nature*, 60, 161–171.
- Rhen, T., Schroeder, A. (2010). Molecular mechanisms of sex determination in reptiles. *Sexual Development*, 4(1-2), 16–28.
- Saba, V. S., Stock, C., Spotila, J. R., Paladino, F., V., Santidrián-Tomillo, P. (2012). Projected response of an endangered marine turtle population to climate change. *Nature Climate Change* 2, 814–820.
- Sandoval, S. (2008). *Pronóstico de la temperatura de los nidos de tortuga golfina (Lepidochelys olivacea) en función de la temperatura ambiente, la profundidad y el calor metabólico*. [Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional], CICESE.
- 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), 138–141.
- Santidrián-Tomillo, P., Genovart, M., Paladino, F. V., Spotila, J. R., Oro, D. (2015). Climate change overruns resilience conferred by temperature-dependent sex determination in sea turtles and threatens their survival. *Global Change Biology*, 21(8), 2980-2988.
- Santidrián-Tomillo, P., Saba, V., S., Blanco, G., S., Stock, C., A., Paladino, F., V., Spotila, J., R. (2012) Climate driven egg and hatchling mortality threatens survival of eastern pacific leatherback turtles. *PloS One* 7(5), e37602.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna

silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, publicada el 30 de diciembre de 2010 en el Diario Oficial de la Federación (Modificación del Anexo Normativo III 14/11/19)

- Shanker, K., Pandav, B., Choudhury, B. (2003). An assessment of the olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*) nesting population in Orissa, India. *Biological Conservation*, 115(1), 149–160.
- Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., Crews, D. (2007). Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Developmental Dynamics*, 236(4), 1055–1063.
- Sifuentes-Romero, I., Tezak, B. M., Milton, S. L., Wyneken, J. (2018). Hydric environmental effects on turtle development and sex ratio. *Zoology*, 126, 89–97.
- Sim, E. L., Booth, D. T., Limpus, C. J. (2015). Incubation temperature, morphology and performance in loggerhead (*Caretta caretta*) turtle hatchlings from Mon Repos, Queensland, Australia. *Biology Open*, 4(6), 685–692.
- Sinervo, B., Mendez-de-la-Cruz, F., Miles, D. B., Heulin, B., Bastiaans, E., Villagran-Santa Cruz, M., Lara-Resendiz, R., Martínez-Méndez, N., Calderón-Espinosa, M., Meza-Lázaro, R., Gadsden, H., Avila, J., Morando, M., De la Riva, I., Sepulveda, P., Duarte, C., Ibarguengoytía, N., Aguilar, C., Massot, M., Lepetz, V., Oksanen, T., Chapple, D., Bauer, A., Branch, W., Clobert, J., Sites, J. W. (2010). Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science*, 328(5980), 894–899.
- Smith, C. A., Shoemaker, C., Roeszler, K. N., Queen, J., Crews, D., Sinclair, A. (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BioMed Central Biology Developmental Biology*, 8(72).
- Sönmez, B. (2018). Relationship between metabolic heating and nest parameters in green turtles (*Chelonia mydas*, L. 1758) on Samandağ Beach, Turkey. *Zoological Science*, 35(3), 243-248.

- Staines, M. N., Booth, D. T., Madden, C. A. Hays G. C. (2020). Impact of heavy rainfall events and shading on the temperature of sea turtle nests. *Marine Biology*, 167, 190.
- Standora, E. A., Spotila, J. R. (1985). Temperature dependent sex determination in sea turtles. *Copeia*, 1985(3), 711-722.
- Stubbs, J. L., Kearney, M. R., Whiting, S. D., Mitchell, N. J. (2014). Models of primary sex ratios at a major flatback turtle rookery show an anomalous masculinising trend. *Climate Change Responses* 1(3). 1-17.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y., Erasmus, B. F., Ferreira de Siquiera, M., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A., Midgley, G., Miles, L., Ortega-Huerta, M., Peterson, A., Phillips, O., Williams, S. E. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427, 145-148.
- Thompson, M. B. (1989). Patterns of metabolism in embryonic reptiles. *Respiration Physiology*, 76(2), 243–255.
- Torres-Maldonado, L. C., Landa-Piedra, A., Moreno-Mendoza, N., Marmolejo-Valencia, A., Meza-Martínez, A., Merchant-Larios, H. (2002). 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.
- Valenzuela, N., Literman, R., Neuwald, J. L., Mizoguchi, B., Iverson, J. B., Riley, J., Litzgus, J. (2019). Extreme thermal fluctuations from climate change unexpectedly accelerate demographic collapse of vertebrates with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*, 9, 4254.
- Valverde R. A., Wingard, S., Gómez, F., Tordoir, M. T., Orrego, C. M. (2010) Field lethal incubation temperature of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryos at a mass nesting rookery. *Endangered Species Research*, 12, 77-86.
- van de Merwe, J., Ibrahim, K., Whittier, J. (2006). Effects of nest depth, shading, and metabolic heating on nest temperatures in sea turtle hatcheries. *Chelonian Conservation and Biology*, 5(2), 210-215

- van Vuuren, D., Sala, O., Pereira, H. (2006). The future of vascular plant diversity under four global scenarios. *Ecology and Society*, 11(2), 25.
- VijayaVenkataRaman, S., Iniyar, S., Goic, R. (2012). A review of climate change, mitigation and adaptation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 878–897.
- Vindas-Picado, J., Yaney-Keller, A., St. Andrews, L., Panagopoulou, A., Santiadrián-Tomillo, P. (2020). Effectiveness of shading to mitigate the impact of high temperature on sea turtle clutches considering the effect on primary sex ratios. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 25, 1509–1521.
- Wallace, B. P., Sotherland, P. R., Spotila, J. R., Reina, R. D., Franks, B. F., Paladino, F. V. (2004). Biotic and abiotic factors affect the nest environment of embryonic leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(3), 423–432.
- 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. *Copeia*, 1998(4), 1086-1088.
- Winter, M., Fiedler, W., Hochachka, W. M., Koehncke, A., Meiri, S., De la Riva, I. (2016). Patterns and biases in climate change research on amphibians and reptiles: a systematic review. *Royal Society Open Science*, 3(9), 160158.
- Wood, A., Booth, D. T., Limpus, C. J. (2014). Sun exposure, nest temperature and loggerhead turtle hatchlings: Implications for beach shading management strategies at sea turtle rookeries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 451, 105–114.
- Wyneken, J., Lolavar, A. (2015). Loggerhead sea turtle environmental sex determination: Implications of moisture and temperature for climate change-based predictions for species survival. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 324(3), 295–314.

- Xenopoulos, M., Lodge, D., Alcamo, J., Märker, M., Schulze, K., van Vuuren, D. (2005), Scenarios of freshwater fish extinctions from climate change and water withdrawal. *Global Change Biology*, 11, 1557-1564.
- Yntema, C., Mrosovsky, N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica*, 36(1), 33-36.
- Yntema, C., Mrosovsky, N. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Canadian Journal of Zoology*, 60(5), 1012–1016.
- Zbinden, J. A., Margaritoulis, D., Arlettaz, R. (2006). Metabolic heating in Mediterranean loggerhead sea turtle clutches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 334, 151–157.