

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Determinación de la proporción sexual de tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*) inmaduras, mediante la detección de testosterona por medio de la prueba de ELISA.

Por:

Br. Iris Marielos Chavarría Pérez.

Br. Mauricio Melara Soriano.

Ciudad Universitaria junio de 2020

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA



Determinación de la proporción sexual de tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*) inmaduras, mediante la detección de testosterona por medio de la prueba de ELISA.

Por:

Br. Iris Marielos Chavarría Pérez.

Br. Mauricio Melara Soriano.

Requisito para optar al título de:

Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Ciudad Universitaria junio de 2020

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO.

SECRETARIO GENERAL: ING. M. Sc FRANCISCO ANTONIO ALARCON
SANDOVAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO: DR. FRANCISCO LARA ASCENCIO

SECRETARIO: ING. AGR. M.Sc. BALMORE MARTINEZ SIERRA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA:

MVZ. M.Sc. RICARDO GAMERO GUANDIQUE

DOCENTES DIRECTORES:

MVZ. JORGE ARMANDO CASTRO MENJÍVAR.

PhD. MICHAEL JOSEPH LILES.

COORDINADORA GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN:

MVZ. M.Sp. MARÍA JOSÉ VARGAS ARTIGA.

Resumen

La determinación sexual en tortugas marinas es un factor de interés ecológico debido a la influencia del cambio climático en la proporción entre hembras y machos de las diferentes especies con determinación sexual termo-dependiente; estos individuos carecen de características sexuales secundarias hasta que llegan a la madurez. Siendo necesario implementar métodos eficaces como la técnica de ELISA para determinar su sexo mediante la cuantificación de testosterona en plasma sanguíneo.

El estudio se realizó en la Bahía de Jiquilisco, ubicada en departamento de Usulután, entre los meses de agosto 2017 y febrero 2018; las unidades experimentales fueron 77 individuos de tortuga Carey en zonas forrajeras de la Bahía de Jiquilisco. La primera fase se realizó a partir de monitoreos acuáticos en los que fueron capturados los individuos, para la segunda fase las muestras fueron enviadas al laboratorio endocrinológico del South West Fisheries Science Center (SWFSC) de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) en La Jolla, California, Estados Unidos para su procesamiento y análisis.

En los resultados se demuestra una proporción sexual de tortugas Carey 5.8 hembras: 1 Macho. Los valores de testosterona de hembras inmaduras tuvieron una variación de 7.7-77.20 pg/ml. Mientras que los machos inmaduros presentaron una variación entre 660.30-3083.20 pg/ml. Respecto a la correlación entre concentración de testosterona y largo curvo de caparazón se obtuvo una probabilidad de ($p=0.783$) en hembras y una probabilidad de ($p=0.0847$) en machos, por lo que no existe relación significativa; para las variables concentración de testosterona y peso se obtuvo una probabilidad ($p=0.741$) en hembras y una probabilidad de ($p=0.7382$) en machos por lo que no existe una relación significativa. Concluyendo que el uso de parámetros morfométricos es poco confiable para el sexado de individuos inmaduros.

Palabras clave: *Eretmochelys imbricata*, Proporción sexual, Testosterona, ELISA, Zonas de alimentación, Bahía de Jiquilisco.

AGRADECIMIENTOS

A la iniciativa Carey del Pacífico Oriental (ICAPO), por la oportunidad de trabajar y colaborar en la generación de conocimiento científico que sea útil para la conservación de la tortuga Carey, su apoyo logístico y técnico para llevar a cabo esta investigación.

Al laboratorio endocrinológico del South west Fisheries Science Center (SWFSC) de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) en especial a la Dra. Camryn Allen por su ayuda, consejos y su interés en la realización de esta investigación.

A las comunidades que tuvimos la oportunidad de visitar durante nuestro trabajo de campo, por su hospitalidad y colaboración.

A NUESTROS ASESORES:

MVZ Oscar Luis Meléndez, MVZ. Jorge Armando Castro Menjívar, PhD. Michael Joseph Liles, por su colaboración, por su paciencia, por apoyarnos en lo necesario para realizar esta investigación, y principalmente por su amistad y confianza.

ESPECIALES A:

Sofía Chavarría y Melissa Valle, por dar su apoyo técnico, logístico y moral en campo.

Don Neita, Nerges y Ray quienes nos apoyaron en nuestra fase de campo y amenizaron cada captura, muchas gracias.

DEDICATORIAS

Al universo y la madre tierra, en especial a la maravillosa especie con la que tuve la oportunidad de convivir, por enseñarnos tanto sin tener necesidad de decir una palabra y por tener la suerte de presenciar tanta belleza y tratar de fomentar el respeto hacia ella.

A mis padres, Cesar Chavarría y Esperanza Pérez por su ejemplo de personas luchadoras y trabajadoras por siempre incentivar y apoyarme para lograr mis metas, por sus consejos y su paciencia y por enseñarme tanto, no bastan las palabras para reflejar mi agradecimiento.

A mis hermanos, Alexander Pérez que a pesar de la distancia siempre me da palabras de aliento para lograr mis objetivos, Sonia Chavarría por su apoyo y compañía durante este largo recorrido, Sofía Chavarría con quien comparto esta gran pasión de la Medicina veterinaria y que con su ayuda durante todo el proceso de la carrera y de tesis estoy un paso más cerca de también llamarla colega. Muchas gracias

A mis compañeros, Mauricio, Logan y Carlos, por acompañarme en este largo proceso en el que tuvimos tantas aventuras.

A mis amigos, Gerson, Chopin y Funes quienes me acompañaron y apoyaron durante tanto tiempo.

A nuestros asesores MVZ Luis Meléndez, MVZ. Jorge Armando Castro Menjívar, PhD. Michael Joseph Liles, por su ayuda y acompañamiento durante toda nuestra investigación, por su tiempo y sus conocimientos.

A cualquier otra persona que me haya incentivado a seguir adelante, gracias.

IRIS MARIELOS CHAVARRÍA PÉREZ

DIOS TODO PODEROSO, Que me mantiene con fe, paciencia y ganas de seguir luchando por conseguir las metas que me propongo. Por darme sabiduría en momentos que parecen no tener una salida por tal motivo todo este largo camino que he recorrido en esta linda y apasionante carrera ha sido tomado de la mano de nuestro dios todo poderoso y la honra y gloria sea para él.

A MIS PADRES, Carlos Melara Ardón por estar siempre a mi lado apoyarme y darme su ejemplo de persona responsable, honesta y que me ha forjado el carácter para salir adelante en las dificultades que se presentan en la vida diaria. Por tenerme paciencia y brindarme siempre consejos para poder ser una persona de bien y evitar problemas, Teodolinda Consepción Soriano Deras, Mi madrecita querida que Dios en gloria la tenga fue y seguirá siendo el regalo más grande que Dios me dio y que por cosas del destino su luz se apagó en el proceso de mi tesis. Fue mi gran inspiración en todo el proceso y ejemplo de humildad, fe y esperanza de que todo lo que se propone se puede lograr. Por tal motivo este logro es en su honor que estoy seguro que ella desde el cielo me está viendo y me sigue apoyando.

A MIS HERMANOS (AS), Fredy Melara, Luis Melara, Roberto Melara, Víctor Melara, Mirna Melara, Aminta Melara, Gracias por confiar en que lo podía lograr y apoyarme siempre en cada momento por darme sus consejos, compartir sus sabidurías y colaborar a mis padres para que yo pudiera ausentarme del hogar para lograr este objetivo que es mi gran pasión.

A MI COMPAÑERA DE TESIS, Iris Chavarría, Que vivimos momento difíciles en el desarrollo de nuestro proyecto de investigación pero que logramos superar. Por su paciencia y amabilidad en todo el desarrollo del tema que jamás tuvo un mal gesto hacia mi persona.

A MIS DOCENTES, Desde el inicio de mi preparación Académica hasta llegar a la etapa universitaria: a los Médicos Veterinarios, Ingenieros Agrónomos Y Licenciados en Química por dar todo su esfuerzo y conocimiento para forjar buenos profesionales en la rama de la Medicina Veterinaria. Además agradezco a todas las personas que son incontables que de una u otra forma me apoyaron a lo largo de mi carrera por darme su apoyo y confianza en que podía lograrlo. GRACIAS.

MAURICIO MELARA SORIANO

Índice General

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.....	3
2.1 Historia natural general de las tortugas marinas.....	4
2.2 Clasificación Taxonómica de la tortuga carey.....	4
2.3 Características generales.....	4
2.3.1 Caparazón.....	5
2.3.2 Cabeza.....	5
2.3.3 Extremidades.....	5
2.3.4 Coloración.....	5
2.3.5 Plastrón.....	5
2.4 Características biológicas de las tortuga Carey.....	5
2.4.1 Tamaño.....	6
2.4.2 Alimentación.....	6
2.4.3 Hábitat.....	6
2.4.4 Anidación.....	7
2.4.4.1 Anidación de la tortuga carey en el Caribe y Atlántico Occidental.....	7
2.4.4.2 Anidación de la tortuga carey en el Golfo de Fonseca.....	7
2.5 Estado de conservación en el Pacífico Oriental.....	8
2.6 Estado de conservación de tortugas carey en El Salvador.....	8
2.7 Amenazas que afecta la supervivencia de las tortugas Carey.....	9
2.7.1 Consumo de huevos.....	9
2.7.2 Pesca incidental.....	9
2.7.3 Depredación por animales domésticos.....	10
2.7.4 Comercio de productos.....	10
2.7.5 Enfermedades.....	10
2.7.6 Desarrollo costero.....	10
2.7.7 Desechos sólidos y líquidos.....	10
2.8 Determinación sexual en tortugas marinas.....	11
2.9 Estimación de la proporción sexual en neonatos.....	11
2.10 Técnicas de sexado para tortugas juveniles.....	11
2.10.1 Laparoscopia.....	12
2.10.2 Determinación sexual por detección de hormonas.....	12
2.10.2.1 Radioinmunoensayo de Testosterona (RIA).....	13
2.10.2.2 Técnica ELISA de testosterona.....	14
2.10.2.3 Resultados y comparación entre ELISA y RIA.....	14
3. Materiales y métodos.....	15
3.1 Metodología de campo.....	16
3.1.1 Captura de individuos.....	16
3.1.2 Medición e identificación de tortugas.....	16
3.1.3 Manejo y recolección de muestras de sangre.....	17
3.1.3.1 Extracción de muestra de Sangre.....	17
3.2 Metodología de laboratorio.....	18
3.3 Metodología estadística.....	20
3.3.1 Proporción sexual.....	20
3.3.2 Determinación de largo de caparazón, peso y concentración de testosterona.....	21
4. Resultados y discusión.....	22
4.1 Proporción sexual.....	22
4.2 Cuantificación de concentración de testosterona (pg/ml).....	23

4.3 Relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.....	24
4.4 Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas hembra.....	25
4.5 Relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho.....	26
4.6 Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas macho.....	27
5. Conclusiones.....	28
6. Recomendaciones.....	29
7. Bibliografía.....	30
8. Anexos.....	35

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación sexual de los especímenes de tortuga Carey muestreados en la bahía de Jiquilisco.....	22
Tabla 2. Datos estadísticos para la variable concentración de testosterona en tortugas Carey inmaduras.....	23

Índice de figuras

Figura 1. Relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.....	24
Figura2. Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas hembra.	25
Figura 3. Relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho.....	26
Figura 4. Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas macho	27

Índice de anexos

Figura A-1. Ciclo de vida de las tortugas marinas.....	35
Figura A-2. Características morfológicas de la tortuga Carey.....	35
Figura A-3. Mapa de ubicación de población forrajera de tortuga Carey en Bahía de Jiquilisco.....	36
Figura A-4. Tortuga macho y hembra, sexado por observación de características sexuales secundarias.....	36
Figura A-5. Anatomía de tortuga Boba hembra inmadura.....	37
Figura A-6. Anatomía de tortuga Verde y tortuga Boba macho inmadura.....	37
Figura A-7. Variación estacional de la concentración de testosterona.....	38
Figura A-8. Mapa de los sitios de captura para el estudio.....	38
Figura A-9. Referencias anatómicas para la toma de medidas morfométricas.....	39
Figura A-10. Vista dorsal de las venas yugulares externas.....	39
Figura A-11. Muestras de plasma.....	40
Figura A-12. Esquema del proceso de ELISA competitivo.....	40
Figura A-13. Representación gráfica de proporción sexual.....	41
Tabla A-1. Tabla resumen de datos morfométricos para hembras juveniles.....	41
Tabla A-2. Tabla resumen de datos morfométricos para machos juveniles.....	42
Tabla A-3. Tabla resumen de datos morfométricos para individuos con sexo desconocido.....	42
Tabla A-4. Análisis de regresión lineal para la relación entre el concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.....	42
Tabla A-5. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados para la relación entre el concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.....	43
Tabla A-6. Análisis de varianza. Para la relación entre el concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.....	43
Tabla A-7. Análisis de regresión lineal para la relación entre el concentración de testosterona y peso de tortugas hembra.....	43
Tabla A-8. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados para la relación entre el concentración de testosterona y peso tortugas hembra.....	44
Tabla A-9. Cuadro de análisis de varianza. Para la relación entre el concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.....	44
Tabla A-10. Análisis de regresión lineal para la relación entre el concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho.....	44
Tabla A-11. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados para la relación entre el concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho.....	45
Tabla A-12. Análisis de varianza. Para la relación entre el concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho.....	45
Tabla A-13. Análisis de regresión lineal para la relación entre el concentración de testosterona y peso de tortugas macho.....	45
Tabla A-14. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados para la relación entre el concentración de testosterona y peso tortugas macho.....	46
Tabla A-15. Análisis de varianza para la relación entre el concentración de testosterona y peso de tortugas macho.....	46

1. Introducción

Las tortugas marinas tienen un rol importante en los ecosistemas, regulando el transporte de nutrientes de playas, a través de la diseminación de flora y fauna. Algunas especies de tortugas marinas contribuyen al mantenimiento de áreas marinas y ayudan a mantener los arrecifes limpios. Se puede considerar este grupo de animales como un controlador biológico ya que preserva el equilibrio en los ecosistemas evitando el aumento demográfico de varias poblaciones de organismos marinos (medusas, crustáceos, pastos marinos, entre otros) (Campbell 2014).

La determinación de la proporción sexual es un tema de gran interés en la biología y conservación de las tortugas marinas, está se ve dirigida por la temperatura de incubación de los huevos; temperaturas mayores de la temperatura pivote (temperatura que produce 50% de hembras y 50% de machos) producen un mayor porcentaje de hembras y temperaturas menores producen un mayor porcentaje de machos (Wibbel 2003). Esto genera diferentes interrogantes en cuanto a su ecología, conservación y evolución (Chacon-Chaverri 2004). Se desconoce la proporción sexual natural de las poblaciones de tortugas marinas en estadio inmaduro, y si esta varía entre las diferentes poblaciones (Wibbel 2003).

En diferentes estudios se han obtenido proporciones altamente parcializadas de neonatos hembras; solamente hay una mayor producción de machos correspondiente a los meses en los que existe un descenso en la temperatura (Marcovaldi *et al.* 2014). A partir de estos datos se han presentado estudios sobre la amenaza del cambio climático en la biodiversidad de las especies y su capacidad de desarrollar respuestas compensatorias que podrían determinar la probabilidad de sobrevivencia de las mismas (Liles *et al.* 2019).

El primer estudio en el que se evaluó la proporción sexual de la población forrajera de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) fue en el Pacífico oriental, se realizó con el fin de determinar el sexo de los especímenes y posteriormente obtener la proporción entre hembras y machos de la especie; los resultados fueron congruentes entre el análisis de ELISA, laparoscopia y el Radioinmunoensayo, obteniendo una alternativa para la determinación sexual de los individuos, evitando el uso de métodos invasivos y de mayor costo (Allen *et al.* 2015). El nivel de testosterona en plasma puede ser utilizado como un indicador preciso del sexo de una tortuga marina inmadura (Owens 1997). La técnica de

ELISA ha sido utilizada en especies marinas para el control de su salud, reproducción, respuesta al estrés y determinación sexual siendo una técnica precisa y de menor costo (Allen *et al.* 2015).

En El Salvador no se cuenta con investigaciones para determinar la proporción sexual en esta especie en estadio inmaduro, lo que dificulta su conservación, el conocimiento de estos datos puede dar lugar a la formulación de estrategias de conservación y proyección de supervivencia de la especie. Es importante establecer la proporción sexual de las tortugas Carey para conocer parámetros demográficos y la dinámica reproductiva de la especie, debido a que son datos que contribuyen a determinar la viabilidad y su éxito reproductivo y por lo tanto la supervivencia de la especie, esto es especialmente importante para especies en peligro crítico de extinción y con poblaciones severamente agotadas como la de la tortuga Carey.

2. Revisión bibliográfica

2.1 Historia natural general de las tortugas marinas

Después de la eclosión, a los neonatos puede llevarles varios días desenterrarse y emerger del nido, lo que habitualmente ocurre durante la noche. Una vez en la superficie de la playa, se arrastran hasta el mar y nadan aguas adentro alejándose de la costa. Durante su breve estancia en tierra, los huevos, son objeto de diversos depredadores y otras fuentes de mortalidad, como la compactación o erosión de la playa en la que han sido depositados. Para salir del nido y llegar al agua lo más rápido posible, las crías tienen que dar una serie de respuestas "innatas", no aprendidas, a diversos estímulos (Chacon-Chaverri 2004).

Al emerger, se orienta hacia la playa, moviéndose hacia aquella parte del horizonte en la que la luz tiene mayor intensidad, por lo general, la luz de longitud de onda más corta. Las crías pueden detectar movimientos orbitales, lo que les permite orientarse hacia las olas cuando están en la superficie o bajo el agua, así como en completa oscuridad. Tras alejarse de la costa, las crías suelen mantener la misma dirección mar adentro que la que tomaron al dejar la playa, incluso si el ángulo de ataque a las olas no es el mismo que cuando comenzaron a alejarse de la costa (Chacon-Chaverri 2004). Recientes investigaciones indican que los neonatos usan señales geomagnéticas para mantenerse en los sistemas de corrientes apropiados (Sillman *et al* 2002). Una vez en alta mar y en medio de las corrientes oceánicas, las crías pueden refugiarse en masas de restos flotantes en el mar (Eckert *et al* 1999).

Los primeros años las tortugas viven en forma pelágica, lo cual significa que viven en mar abierto (Sillman, 2002). Tienen una dieta principalmente carnívora y se desplazan con las corrientes. El pasaje de las aguas pelágicas a las bentónicas implica un cambio espectacular de los hábitos, especialmente la dieta (Eckert *et al* 1999).

Los hábitats forrajeros de las tortugas marinas pueden variar mucho en cuanto a sus características físicas y biológicas como la profundidad, presencia o ausencia de mareas, corrientes, velocidad del viento, turbidez del agua estos son algunos factores que se

toman en cuenta para el estudio de tortugas marinas en hábitats forrajeros esto siempre es considerado dependiendo de la especie en estudio (Eckert *et al* 1999).

Como la mayoría de las demás especies de tortugas marinas, se piensa que las Carey pasan por varios hábitats de cría o de desarrollo esto puede variar a partir de la especie. Tras alcanzar la madurez sexual, las tortugas emigran de las zonas de alimentación o forrajeo a zonas de anidación. Una vez hechas todas las puestas de la temporada, la hembra vuelve a emigrar hacia su zona de alimentación (Liles *et al* 2014). Continuará migrando entre las zonas de alimentación y de reproducción durante toda su vida (Chacon-Chaverri 2004) (Ver anexos figura A-1).

2.2 Clasificación Taxonómica de la tortuga carey:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Reptilia

Orden: Testudines

Familia: Cheloniidae

Género: *Eretmochelys*

Especie: *Eretmochelys imbricata*. (CITES 2010).

2.3 Características generales

Las tortugas carey son reptiles marinos muy complejos y especializados. Para madurar, llegar a la edad adulta, reproducirse y completar el ciclo vital necesitan una diversidad de medios, en particular playas terrestres, el mar abierto, y aguas costeras y estuarinas. Durante un ciclo vital normal, las tortugas se dispersan y migran recorriendo largas distancias, a menudo miles de kilómetros, desplazándose habitualmente hacia alta mar, así como hacia las aguas territoriales de diferentes países (Chacon-Chaverri 2004).

2.3.1 Caparazón:

Es de oval, con un margen posterior marcadamente aserrado y con escudos gruesos y traslapados (imbricados) a excepción en crías y en algunos adultos; cuatro pares de escudos costales, cada uno con un borde posterior ligeramente rasgado (Eckert *et al* 1999).

2.3.2 Cabeza:

Relativamente angosta; ancho hasta 12 cm; con un pico recto y parecido al de un ave; posee dos pares de escamas pre frontales (Eckert *et al* 1999) (Ver anexos figura A-2).

2.3.3 Extremidades:

Las aletas delanteras son de longitud mediana en comparación con las de otras especies; con dos uñas en cada aleta (Eckert *et al* 1999).

2.3.4 Coloración:

Presenta dorsalmente café (claro a oscuro) en crías, con frecuencia presenta una fuerte pigmentación con vetas color ámbar y café en juveniles y en adultos más jóvenes; ventralmente matices de amarillo pálido a blanco, algunas veces con manchas negras (particularmente en especímenes del Pacífico) (Eckert *et al* 1999).

2.3.5 Plastrón:

Posee cuatro pares de escudos inframarginales (Eckert *et al* 1999).

2.4 Características biológicas de las tortugas carey:

El ciclo vital es complejo y muy especializado. La tortuga Carey tarda más de un decenio en alcanzar la madurez sexual. Un adulto tiene posibilidades de sobrevivir y reproducirse durante al menos otros diez años. Es probable que, durante su vida un individuo viaje miles de kilómetros, visitando territorios de varios países, así como el mar abierto (Chacon-Chaverri 2004).

La tortuga Carey juega un papel ecológico importante en la salud del ecosistema de los arrecifes, al ser altamente selectiva se alimenta solamente con tipos específicos de

esponjas, lo cual le da oportunidad a otras especies para competir por el espacio (León et al., 2002).

2.4.1 Tamaño:

El crecimiento de las tortugas Carey es lento, alcanzando la madurez sexual aproximadamente entre 17–40 años (Chaloupka *et al.* 2012). Los rangos de crecimiento varían según la población y aparentemente la tasa de crecimiento decrece considerablemente después de haber alcanzado la madurez sexual (Dick 2005). Las crías recién emergidas miden aproximadamente 4 cm de longitud del caparazón (Liles *et al.* 2019), estas tienen hábitats pelágicos hasta alcanzar aproximadamente los 25 cm de Largo Curvo de Caparazón (LCC) (Eckert 1999); sin embargo, en el Pacífico Oriental hay evidencia que tortugas Carey posneonato y juveniles pequeñas utilizan hábitat nerítico al menos durante una parte de los primeros años de su vida (Liles *et al.*, 2017). Se consideran ejemplares inmaduros a individuos con medidas <85 cm de LCC y maduros de ≥ 85 cm LCC (Liles *et al.* 2015). El peso promedio registrado para tortugas Carey maduras en el Caribe es de 80 kg y el mayor es de 127 kg (Eckert 1999).

2.4.2 Alimentación:

Las tortugas Carey tienen un pico similar al del halcón, que utilizan para morder y extraer invertebrados blandos de los arrecifes. En muchos lugares, su dieta consiste en determinadas esponjas, y supone la ingesta sistemática de toxinas potentes, así como de espículas vítreas. Excepto varios peces muy especializados de los arrecifes de coral, no se conoce ningún otro vertebrado capaz de tolerar una dieta nociva como ésta (Chacon-Chaverri, 2004). Las tortugas Carey que habitan en los estuarios en el Pacífico Oriental consumen mangle, esponjas y algunos crustáceos en su dieta habitual (Rivas 2016).

2.4.3 Hábitat:

La tortuga Carey se encuentra típicamente en aguas tropicales y subtropicales del Atlántico, Pacífico e Índico, donde aparece en zonas de arrecifes de coral, áreas rocosas, estuarios y lagunas costeras. Se encuentra principalmente en el Mar Caribe, el norte del Golfo de México, las Antillas Mayores y Menores y a través de América Central hacia el sur hasta Brasil (León y Diez 1999).

En el Pacífico oriental ha sido observada en el Golfo de California y los estados del noroeste de México y desde las costas centroamericanas hasta Colombia y Ecuador en América del Sur; existe variación del hábitat entre las diferentes especies y poblaciones, la tortuga Carey del Pacífico oriental habita principalmente en estuarios conformados por canales con menos de 50 metros de ancho y bosques de manglar de agua salada, siendo las poblaciones únicas con estas características (Gaos *et al.* 2012).

2.4.4 Anidación:

Cada hembra abandona el mar, se arrastra hasta una playa arenosa y localiza un lugar para anidar por encima del nivel de marea alta. Habitualmente, las tortugas carey anidan entre la vegetación terrestre o bajo ella. Una hembra puede hacer más de un intento de excavar un nido antes de desovar con éxito una cámara situada por lo menos 10 cm por debajo de la superficie de la arena y de hasta 45 cm de profundidad. Cada huevo pesa 25 gramos o más, y la nidada promedio tiene unos 140 huevos (pero a veces puede llegar hasta 250). Después de cubrir el nido, y tras haber pasado entre una o dos horas en tierra, la tortuga regresa al mar. A intervalos de aproximadamente 15 días, el mismo espécimen retorna, generalmente a la misma franja de la playa. Para anidar otra vez. Este proceso se repetirá hasta que acabe de anidar esa temporada cuando habrá dejado por lo menos dos hasta cinco nidadas (Chacon-Chaverri 2004).

2.4.4.1 Anidación de la tortuga Carey en el Caribe y Atlántico Occidental:

Las nidadas se esparcen a través de la región, desde el Caribe (insular y continental) hasta América del Sur, tan lejos como el Estado de Espírito Santo en la costa Sur- Central de Brasil. La densidad de las anidaciones aún no ha sido cuantificada en más de un tercio de las playas de anidación de las tortugas Carey, aunque se cree que la mayoría de estas tienen menos de 25 nidadas por año (Campbell 2014).

El 51% de los sitios que se conoce que mantiene menos de 25 nidadas por año, representan más del 80% de todas las nidadas en la región (Campbell 2014).

2.4.4.2 Anidación de la tortuga Carey en el Golfo de Fonseca:

El sector del Golfo de Fonseca que pertenece a El Salvador. Posee un área total de 8.3 km² y una superficie acuática de 2.1 km², incluyendo una línea litoral de 321 km. Presenta

una gran diversidad de hábitat terrestres y costeros-marinos como bosques de pino, sabanas de morro, bosques de montañas costeras, playas, lagunas estacionales, pantanos, manglares, bahías y esteros, entre otros (Vásquez *et al.* 2008).

En contraste con las tortugas Carey en el Caribe e Indo-Pacífico que seleccionan sitios de anidación en playas estables del mar, las tortugas carey del Pacífico Oriental típicamente anidan en playas dinámicas dentro de los esteros de manglar y bosque de agua salada, esto es un cambio de gran importancia en cuanto a la historia natural de las tortugas Carey y de las diferentes especies y poblaciones que se encuentran habitando en mar abierto y arrecifes de coral (Liles *et al.*, 2015). En toda la región del Pacífico Oriental, un 80% de la actividad reproductiva de tortugas Carey se concentra en el área del Golfo de Fonseca, específicamente en Bahía de Jiquilisco, El Salvador y Estero Padre Ramos, Nicaragua (Liles *et al.* 2011, 2015; Gaos *et al.* 2012) (Ver anexos figura A-3).

Se han identificado otros sitios de anidación de tortugas Carey en la región, estos sitios tienen menores niveles de anidación (como las playas de El Maculís en El Salvador y de Aserradores en Nicaragua) (Gaos *et al.* 2017).

2.5 Estado de conservación en el Pacífico Oriental:

A nivel mundial la tortuga Carey se encuentra en peligro crítico de extinción según la Lista Roja del IUCN. Las tortugas Carey se encuentran raramente o incluso están ausentes en la mayoría de los sitios de anidación del Pacífico oriental. Por muchos años, se creyó que la población estaba a punto de extinguirse. Sin embargo, varios descubrimientos nuevos han identificado sitios importantes de anidación en El Salvador, Nicaragua, y Ecuador, estos sitios tienen entre 400 y 600 nidos por año. Aunque la población está altamente en peligro de extinción, con aproximadamente 600 nidos cada año a lo largo del Pacífico Oriental, no está claro cuánto puede estar agotada esta población en comparación con los niveles de años anteriores (Vásquez y Liles 2008; Gaos *et al.* 2010; Liles *et al.* 2015).

2.6 Estado de conservación de tortugas Carey en El Salvador:

El Salvador es el país más pequeño de Centroamérica, y posee una alta densidad poblacional lo que ha llevado a la sobreexplotación de muchos de los recursos naturales del país, incluyendo a las especies de tortugas marinas, donde se considera que aproximadamente el 99% de todos los huevos son extraídos, para el consumo humano a nivel nacional (Vásquez *et al.* 2008). En los últimos años, debido a los esfuerzos y

estrategias de conservación como la recolección de huevos y su reubicación en corrales de incubación la extracción de los huevos de tortugas Carey se ha reducido hasta un 95% en la Bahía de Jiquilisco (Liles *et al.* 2019).

La República de El Salvador, el Convenio sobre la Diversidad Biológica y las leyes nacionales brindan protección a la tortuga Carey como una especie en peligro crítico de extinción (Liles *et al.* 2014). Existen leyes que prohíbe la recolección y venta de productos de tortugas marinas para fines distintos de conservación y que mitigan la captura incidental de tortugas marinas en la pesca. Sin embargo, la aplicación de estas medidas está limitada por parte de las autoridades y la escasez de datos existentes sobre la vida, características y mortalidad de la tortuga Carey en El Salvador ha limitado los esfuerzos para recuperar esta población de tortugas marinas (Liles *et al.* 2011).

2.7 Amenazas que afecta la supervivencia de las tortugas Carey:

Las tortugas carey, se les ha cazado por los huevos, la carne y el aceite, son productos buscados desde hace miles de años, pero son las escamas superpuestas del caparazón lo que hacen que esta especie sea tan codiciada, el caparazón bruto no trabajado puede venderse en miles de dólares el kilogramo (Mortimer y Donnelly 2008).

2.7.1 Consumo de huevos:

Es una de las más antiguas actividades realizadas por el hombre, primero fue para satisfacer el hambre, pero con la apertura de facilidades de transporte y conservación de los huevos como la refrigeración el uso pasó a ser más intenso y comercial (Chacon-Chaverri 2004; Vásquez *et al.* 2008; Gaos *et al.* 2010).

2.7.2 Pesca incidental:

La colocación de dispositivos pesqueros en los arrecifes de coral y zonas aledañas tienen el riesgo de atrapar especies que no son el objetivo del jornal pesquero, de manera tal que ocasionalmente varias especies de tortuga marina caen en las redes, entre ellas la Carey (Chacon-Chaverri, 2004; Gaos *et al.* 2010; Liles *et al.* 2017). Además, la pesca con explosivos se encuentra entre las amenazas más severas en ecosistemas de bosque salado (Liles *et al.* 2011), como es la Bahía de Jiquilisco

2.7.3 Depredación por animales domésticos:

Cuando en las comunidades o ciudades costeras la desatención de los animales domésticos provoca que ellos busquen por su cuenta alimento convirtiéndose en animales ferales y depredando tanto nidos como tortugas (Chacon-Chaverri 2004).

2.7.4 Comercio de productos:

Esta actividad humana por su naturaleza mercantil y por darle un valor económico a la carne, huevos, caparazón y otros subproductos induce a que se acrecienten otras amenazas como la cacería, la recolecta de huevos e incluso la visitación (Chacon-Chaverri 2004).

2.7.5 Enfermedades:

La más grave y potencialmente cruel enfermedad es el fibropapiloma que aminora las capacidades fisiológicas de las tortugas hasta provocar la muerte (Chacon-Chaverri 2004).

2.7.6 Desarrollo costero:

La construcción de estructuras que alteran la morfología de la zona costera, instalan iluminación, incrementan la generación de ruidos, promueven la visitación, la contaminación y la pérdida de biodiversidad (Chacon-Chaverri 2004; Gaos *et al*, 2010).

2.7.7 Desechos sólidos y líquidos:

Esta amenaza puede provenir del espacio inmediato como las comunidades colindantes al arrecife coralino, pero también de zonas cuenca arriba (Chacon-Chaverri 2004).

2.8 Determinación sexual en tortugas marinas:

En individuos adultos esto no genera dificultad debido a que los machos presentan características sexuales secundarias durante la pubertad tales como el largo de cola, morfología del caparazón y la morfología característica de uñas en las aletas delanteras (Chacon-Chaverri 2004).

La cola de la hembra es corta y se proyecta ligeramente a través de los bordes de los escudos marginales, esta técnica debe ser utilizada con precaución debido a que algunos machos inmaduros podrían no haber desarrollado completamente la cola y podrían ser consideradas como hembras adultas por equivocación (Eckert 1999) (Ver anexos figura A-4).

2.9 Estimación de la proporción sexual en neonatos:

La diferenciación sexual en las tortugas marinas, como en un gran número de reptiles, depende de la temperatura del ambiente durante la incubación de los huevos (Marcovaldi *et al.* 2014). Por lo tanto, la proporción de sexos de la descendencia debe diferenciarse en épocas del año y entre años (Mrosovsky *et al.* 1984). La incubación a 25° C produce principalmente machos, mientras que la incubación a temperaturas de 31°C o mayores produce exclusivamente hembras (Wibbels 2003).

2.10 Técnicas de Sexado para Tortugas Juveniles

Existen varios métodos para la determinación sexual de las tortugas inmaduras, entre estos se incluye el examen laparoscópico, ensayo hormonal para concentración de testosterona (T) en el plasma sanguíneo y el Radioinmunoensayo de testosterona (RIA) (Wibbles 2003).

Sin embargo, algunos métodos son logísticamente difíciles de ejecutar en campo. En el caso del Ensayo de la hormonal para la determinación de testosterona y el Radioinmunoensayo es necesaria la toma de muestra sanguínea para la obtención de plasma siendo considerados métodos menos invasivos (Allen *et al* 2015).

Además, el uso de herramientas moleculares para la determinación sexual en tortugas marinas es dificultoso debido a que este no está determinado genéticamente; en lugar de

esto las tortugas son dependientes de la temperatura en la que se desarrolle el embrión durante el período de incubación (Allen *et al.* 2015). El sexo se determina durante el segundo tercio de incubación (conocido como período termosensitivo), en temperaturas templadas se obtienen machos y en temperaturas cálidas se obtienen mayor cantidad de hembras (Mrosovsky, 1984).

2.10.1 Laparoscopia:

La examinación laparoscópica ha mostrado ser un método efectivo de sexado de tortugas marinas juveniles ya que las gónadas pueden ser vistas directamente a través del laparoscópio (Eckert, 1999). La principal desventaja es que el procedimiento es invasivo y potencialmente peligroso para la tortuga, y siempre debe ser realizado por un veterinario entrenado (Lande 1988) (Ver anexos Figura 3) (Ver anexos figuras A-5 y Figura A-6).

2.10.2 Determinación sexual por detección de hormonas:

La información sobre la dinámica hormonal en el ciclo reproductivo de las tortugas marinas es muy limitada. En las tortugas verdes hembras los niveles de testosterona se elevan en el período de receptividad sexual, esta elevación aparentemente aparece durante algunos días, esto sugiere que la testosterona favorece el inicio del comportamiento reproductivo de las hembras (Al-habsi *et al.* 2006).

La testosterona es responsable del desarrollo de características sexuales de tipo secundario en machos vertebrados (Blanvillain *et al.* 2011). El hecho de no poder determinar la sexualidad de un individuo representa un gran problema para la determinación de proporción sexual de individuos inmaduros (Broderick *et al.* 2000).

En estadios inmaduros, no es posible determinar el sexo de las tortugas por características secundarias externas (Blanvillain *et al.* 2011). Pero el sexado de individuos maduros debe ser realizado con precaución cuando se basa en características sexuales de tipo secundario (León, 1999).

Los niveles de concentración de testosterona en tortugas tanto para hembras como para machos pueden variar entre especies y aun entre grupos de poblaciones forrajeras dentro de las mismas especies. Es por ello que es importante determinar el rango de

testosterona para individuos de cada población forrajera de las diferentes especies (Owens, 1978).

Los rangos de concentración de testosterona entre machos y hembras son amplios; sin embargo, al mismo tiempo son bien diferenciados, es por ello que en ocasiones algunos individuos inmaduros mostrarán dos concentraciones de testosterona dentro de los rangos normales de machos y hembras respectivamente, esto puede estar influido por la temperatura del agua dependiendo de la época del año (Al-Hasbi *et al.* 2006) (ver Anexo Figura A-7).

La medición de niveles circulantes de testosterona en tortugas marinas generalmente se determina por medio de la técnica de radioinmuno ensayo (Al-Hasbi *et al.* 2006). A pesar de ello la técnica ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), se considera de elección sobre el RIA debido a que no son necesarios reactivos radiactivos. La técnica de ELISA es más utilizada debido a su menor costo y tamaño siendo conveniente para su uso en campo (Allen *et al.*, 2015).

2.10.2.1 Radioinmunoensayo de Testosterona (RIA):

El nivel de testosterona en suero puede ser usado como un indicador preciso del sexo de una tortuga marina inmadura. El límite de tamaño mínimo para que las tortugas marinas puedan ser sexadas por RIA de testosterona no ha sido bien documentado (Mrosovsky *et al.* 1994). Sin embargo, un estudio no publicado sugiere que puede ser usado para sexar tortugas con un largo recto de caparazón con medidas de 25 cm aproximadamente (Owens 1997).

El principio del radioinmunoensayo se basa en la reacción competitiva entre el péptido o antígeno marcado y el péptido o antígeno no marcado por la unión a un anticuerpo específico. La testosterona es una hormona bastante estable, así que las muestras de suero de tortugas pueden ser almacenadas por períodos prolongados de tiempo a -20°C o menos, con poca o ninguna degradación (Chard 1990). Un solo RIA de testosterona puede incluir fácilmente de 50 a 100 muestras o más, de modo que se provee un medio práctico y de costo efectivo para el sexado de números relativamente grandes de tortugas marinas (Eckert 1999).

2.10.2.2 Técnica ELISA de testosterona:

La técnica de ELISA ha sido utilizada en especies marinas para su control de salud, reproducción, respuesta al estrés y determinación de sexo (Allen *et al.* 2015).

El kit de ELISA de testosterona es un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa de testosterona en fluidos biológicos principalmente de suero o plasma sanguíneo. Este se basa en la utilización de un anticuerpo monoclonal dirigido a testosterona para ligar de forma competitiva la testosterona en el estándar, muestra o una molécula de fosfatasa alcalina, formando un enlace covalente con la testosterona.

Para hembras de tortuga verde (*Chelonia mydas*) inmaduras el rango normal de concentración de testosterona es de 4.1-113.1 pg/ml y en machos inmaduros es 198.4-2,613.0 pg/ml; mientras que para hembras maduras el rango de concentración normal de testosterona es de 4.6-281 pg/ml, y en machos 112.4-112,094.2pg/ml (Allen *et al.*2015).

2.10.2.3 Resultados y comparación entre ELISA y RIA

Existen estudios que dan como resultado la gran similitud entre el RIA y ELISA, las concentraciones de testosterona derivadas de las muestras fueron analizadas por medio de los dos métodos en los que se utilizó un anticuerpo diferente. Además, la determinación sexual se basa en la concentración de testosterona obtenida del análisis de ELISA. Sin embargo, cuando se obtienen concentraciones altas de testosterona en algunas hembras sexualmente activas puede dar lugar a predicciones incorrectas en ambos análisis de RIA y ELISA. Es decir, una hembra adulta capturada durante su recorrido migratorio puede presentar una alta concentración de testosterona por la presencia de huevos. Esta tortuga puede ser considerada como macho de forma incorrecta en ambos análisis. La testosterona está involucrada en la síntesis de la hormona femenina (estradiol) y se sabe que las tortugas verdes presentan altas concentraciones de testosterona circulante (durante la migración, apareamiento y anidación), por lo tanto, podría ser imposible distinguir entre hembras activas reproductivamente y machos inmaduros. Por lo tanto, esto se considera como un problema para poblaciones forrajeras en caso de la presentación de hembras reproductivamente activas (Allen *et al.* 2015).

3. Materiales y métodos

El lugar en el que se realizó el estudio es la Bahía de Jiquilisco, ubicada en departamento de Usulután al oriente de El Salvador, en las siguientes coordenadas: 13° 13' Latitud Norte y 88° 32' Longitud Oeste en la parte Central, 13° 15' Latitud Norte y 88° 49' Longitud Oeste en el Sur occidente y 13° 15' Latitud Norte y 88° 21' Longitud Oeste en el extremo nororiental (MARN, 2013a); el lugar presenta una altura mínima de los 0 msnm y la altitud máxima registrada es de 40 m.s.n.m. (MARN, 2013b); las condiciones climáticas que caracterizan la zona son temperaturas en promedio de 26.7°C, con oscilaciones desde los 20.3°C a 34.6°C como temperatura máxima, en cuanto a la humedad relativa que caracteriza la zona va desde los 65.15% durante la época seca y durante la época lluviosa de 78.15% (MARN 2013a).

El estudio se realizó entre los meses de agosto 2017 y febrero 2018; las unidades experimentales a tomar en cuenta son 77 individuos de la especie de tortuga Carey inmaduros con largo curvo de caparazón (LCC) <85 cm que se encontraron en zonas de alimentación que pertenecen a la Bahía de Jiquilisco, Usulután. La primera fase tuvo una duración aproximada de cuatro meses, esta se llevó a cabo a partir de monitoreos acuáticos en los que se capturaron los individuos a muestrear con la colaboración de miembros de la Iniciativa Carey del Pacífico Oriental (ICAPO), se recolectaron los datos y muestras necesarias que fueron procesadas en la estación biológica de ICAPO en la bahía de Jiquilisco y posteriormente en la segunda fase las muestras fueron enviadas al laboratorio endocrinológico del South west Fisheries Science Center (SWFSC) de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) en La Jolla, California de los Estados Unidos para su procesamiento y análisis, su duración fue de aproximadamente dos meses.

3.1 METODOLOGIA DE CAMPO

3.1.1 Captura de individuos

La población de tortugas que se tomaron en consideración para este estudio son los individuos inmaduros de tortuga Carey en las zonas de forrajeo de la Bahía de Jiquilisco, Usulután, principalmente en los esteros Rincón grande, Santa Rosa, Los Birriondos, Cojoyón y La Marta. Estos ejemplares pueden ser capturados independientemente de la época del año (Ver anexos figura A-8).

La captura de los ejemplares se llevó a cabo mediante el embarque de lanchas y con la colaboración de tres pescadores de la zona; se realizó mediante la visualización de la tortuga; y cuando se observó la cabeza del individuo a flote, se procedió a realizar el lanzamiento en forma de media luna con una red artesanal de nylon que cuenta con una altura de 7.5 metros y 400 metros de largo y con un ancho de malla de 6 pulgadas; al capturar a la tortuga se procedió a levantarla y posicionarla en la lancha para continuar con el protocolo que se detalla a continuación.

3.1.2 Medición e identificación de tortugas

Para la toma de medidas se realizó el siguiente protocolo, el largo curvo de caparazón (LCC) fue medido desde el corte del cuello hasta la porción distal del escudo marginal posterior utilizando una cinta métrica flexible tipo sastre. Para la medición del ancho curvo de caparazón (ACC) no existe referencia anatómica, por lo tanto, se midió el punto más amplio del caparazón de un extremo a otro. La medición del largo de la cola se realizó desde el borde distal de la cola hasta el borde exterior del plastrón utilizando una cinta métrica (Ver anexos figura A-9). El tamaño promedio de hembras anidantes maduras en la Bahía de Jiquilisco es de 85 cm LCC (Liles *et al.* 2015), por lo cual las tortugas <85 cm LCC se consideran como inmaduras; mientras que individuos ≥ 85 cm LCC se consideran maduros (Ver anexos Tabla A-1, tabla A-2 y tabla A-3).

El objetivo primario del estudio es la determinación sexual de tortugas inmaduras por lo tanto al utilizar la delimitación de 85 cm LCC se reducirá la selección errónea de machos y hembras inmaduros. Las tortugas fueron pesadas utilizando una báscula análoga con capacidad de 60 libras y se identificaron con marcas metálicas externas INCONEL con un

código único para cada ejemplar, siendo colocados en la primera escama proximal de las aletas anteriores, el número correlativo menor en la aleta anterior izquierda, y el número correlativo mayor en la aleta anterior derecha. Adicionalmente se colocó un Transmisor Pasivo Integrado (PIT por sus siglas en inglés), este es un dispositivo electromagnético con un chip integrado que posee un código único, el cual es insertado por medio de una aguja por vía subcutánea o intramuscular en la aleta anterior derecha en un lugar cercano a la placa metálica correspondiente; para la lectura del microchip se requiere la utilización de un lector o escáner.

3.1.3 Manejo y recolección de muestras de sangre.

3.1.3.1 Extracción de muestra de Sangre:

Se recolectaron muestras de sangre de 77 individuos inmaduros de tortuga carey. La toma de muestra se realizó en un tiempo estimado de entre tres y cinco minutos, inmediatamente después de la captura con el propósito de reducir la influencia en la concentración de testosterona circulante debido al estrés generado durante el proceso de captura. Las muestras de sangre fueron extraídas del seno cervical dorsal (Wyneken 2004) (Ver anexos, figura A-10); la tortuga fue colocada en posición esternal con la cabeza dirigida hacia abajo para facilitar la extracción de la muestra.

Para obtener la muestra de sangre se hizo uso de guantes de latex y procedió a desinfectar el área en la que se realiza la punción con alcohol etílico al 70%. El largo y tamaño óptimo de la aguja requerida para el muestreo puede variar dependiendo del tamaño de la tortuga y la especie, una aguja de 1.5 cm calibre 22 es útil para la mayoría de tortugas juveniles (Ver anexos, figura A-10). Para la recolección de la muestra se utilizan tubos con heparina de litio con capacidad de 4 ml. La muestra requerida para este estudio es de 4 ml de sangre que serán conservadas a una temperatura entre 4°C y 8°C hasta la centrifugación de la muestra (Eckert 1999).

Las muestras fueron trasladadas a la estación biológica ubicada en la Isla de San Sebastián, mediante el uso de una hielera acompañada con refrigerante tipo gel. Posteriormente en el área de laboratorio se realizó la centrifugación de las muestras a 5,000 rpm, durante 10 minutos. Posteriormente se colocó la alícuota de 2 ml de plasma sanguíneo en un criovial con capacidad de 3 ml y se almacenó a una temperatura de -180 °C hasta la ejecución del análisis (Ver anexos, figura A-11).

3.2 METODOLOGÍA DE LABORATORIO

Las muestras fueron enviadas al laboratorio endocrinológico del SWFSC de la NOAA para su procesamiento y análisis que se detalla a continuación:

Para el análisis de las muestras se utilizó el kit comercial de ELISA (Catalogo # ADI-900-065, ENZO Life Sciences, Plymouth, PA) para detección de testosterona para determinar su concentración en las muestras de plasma obtenidas todas estas muestras fueron cuantificados con su respectivo duplicado. Los estándares de las concentraciones conocidas fueron preparadas de acuerdo al protocolo indicado en el kit comercial, utilizando el tampón fosfato salino (PBS) con albumina de suero bovino (BSA), utilizados como la línea basal o cero, se detalla a continuación:

Las hormonas esteroideas son extraídas del plasma. Una alícuota de 50-600 μL de plasma que posteriormente fue colocada en un tubo agregando 4 ml de éter etílico anhidro, con el fin de obtener la testosterona del plasma debido a que esta hormona se puede encontrar unida a proteínas plasmáticas.

Luego cada tubo con plasma y éter fue colocado en nitrógeno líquido adonde el estrato de plasma es congelado y el estrato de éter que contiene las hormonas es decantado en otro tubo y desecado bajo una corriente constante de nitrógeno durante 20 minutos.

Las muestras son reconstituidas con 1.1 ml de acetona al 100% con el fin de aumentar la eficacia de la extracción y recuperación de testosterona de la muestra por medio del uso de un solvente orgánico.

Después de la reconstitución de la muestra mediante el uso de acetona, una alícuota de 1 ml fue desecada durante 16 horas.

Las muestras extraídas son reconstituidas en 250 μL de 0.01 M de buffer fosfato salino con 0.1% de albumina bovina, siendo colocado en el vórtex durante 15 minutos y luego manteniéndolo en baño de maría durante 30 minutos (Allen *et al.* 2015).

La eficiencia de la extracción fue determinada al adicionar 10.0 ng de testosterona de kit comercial de ELISA para testosterona, el cual ha sido utilizado para establecer los niveles de la hormona a una muestra de plasma con una concentración baja de testosterona conocida antes de la extracción.

La cantidad de testosterona fue extraída y cuantificada de la muestra; así como de una alícuota de una muestra de plasma con baja concentración de testosterona sin adicionar testosterona (Ver anexos figura A-12). La relación final de la medición de testosterona menos la cantidad de la muestra no claveteada sobre la cantidad de testosterona adicionada conocida se utilizó para estimar la eficiencia de la extracción (Allen et al. 2015).

Se utilizó un espectrofómeto para la lectura de densidad óptica dentro de cada pocillo de la placa de ELISA. El resultado de la concentración de testosterona (pg/ml) fueron calculadas usando parámetros para el programa de ajuste de curva logística.

La sensibilidad efectiva del ensayo es de 1.2 pg/ml después de la corrección del volumen de plasma, el volumen de acetona, la eficacia de la extracción, la reconstitución del volumen y la dilución. El kit de ELISA tiene 100% de reactividad con testosterona, 14.65 de reactividad con 19- hidrottestosterona, 7.20% de reactividad de androstediona, 0.72% de reactividad con dihidroepiandristerona, 0.40% de reactivada con estradiol asi como <0.001% reacción cruzada con estriol, corticosterona, cortisol, cortisona estrona, progesterona y pregnolona.

3.3 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

La población muestreada para esta investigación son las tortugas Carey inmaduras que se encuentran en la zona de forrajeo de la Bahía de Jiquilisco en el departamento de Usulután, de estos individuos se obtuvo una muestra sanguínea para su procesamiento a nivel de laboratorio y asignar el sexo de cada individuo muestreado, mediante la determinación de la concentración de testosterona a nivel plasmático.

Debido a que es una especie en peligro crítico de extinción y a la naturaleza de tipo poblacional del estudio, se utilizó la mitad del estimado poblacional que es de 150 individuos, por lo tanto, el número de muestras a obtener fue de 75 o mayor a este, durante el estudio se recolectaron un total de 77 muestras.

Para hembras inmaduras de la tortuga verde el rango normal de concentración de testosterona que se utilizó es de 4.1–113.1 pg/ml y en machos inmaduros es 198.4–2,613.0 pg/ml; mientras que para hembras maduras el rango de concentración normal de testosterona es de 4.6–281 pg/ml (Allen *et al.* 2015).

Los métodos estadísticos utilizados son de tipo descriptivo e inferencial; se hizo uso de tablas, gráficos, cuadros y medidas de dispersión, así como el programa informático Excel para el procesamiento y análisis de datos y el Software de análisis estadístico InfoStat (Lenguaje de programación).

Se analizaron los datos obtenidos para determinar la proporción sexual de 77 tortugas Carey inmaduras.

3.3.1 Proporción sexual

Para obtener la proporción sexual se tiene lo siguiente:

$$P = a/b$$

a= Numero de hembras

b= Numero de machos

3.3.2 Determinación de largo de caparazón, peso y concentración de testosterona.

Para la determinación de la relación entre el largo de caparazón, el peso de los individuos y la concentración de testosterona se estableció el coeficiente de correlación lineal cuantificando la dependencia entre variables que será representada en un diagrama de dispersión los valores que toman dos variables, el coeficiente de correlación lineal señalará lo bien o lo mal que el conjunto de puntos representados. Para esto se utilizó la siguiente fórmula:

$$r = \frac{1/n * \sum (x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\left((1/n * \sum (x_i - \bar{x})^2) * (1/n * \sum (y_i - \bar{y})^2) \right)^{1/2}}$$

En donde:

El numerador representa la covarianza entre el valor "x" e "y"

El denominador es el producto de las varianzas de "x" y de "y".

4. Resultados y discusión

4.1 Proporción sexual.

Se analizaron las muestras de 77 tortugas Carey inmaduras mediante la técnica de ELISA para testosterona de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 1. Clasificación sexual de los especímenes de tortuga Carey muestreados en la bahía de Jiquilisco. En la siguiente tabla se muestra la distribución de los datos obtenidos correspondientes al número de hembras (64), machos (11) y especímenes de sexo desconocidos (2) con su respectivo porcentaje (Ver anexos figura A-13).

Muestras	Frecuencia	Porcentaje (%)
Hembra	64	83.1
Macho	11	14.3
Desconocido	2	2.6
Total	77	100.0

Para obtener la proporción sexual se tiene lo siguiente:

$$P = a/b \quad P = 64/11 = 5.81$$

a= Número de hembras

b= Número de machos

Por lo tanto la proporción sexual de tortugas Carey inmaduras en la Bahía de Jiquilisco es de 5.8 hembras: 1 Macho.

A partir de estos resultados se acepta la hipótesis de la investigación; en la que se plantea que existe una mayor proporción sexual de hembras que machos de la población de tortugas Carey inmaduras en la Bahía de Jiquilisco

Los resultados obtenidos en este estudio dan respaldo de que la técnica de ELISA es una herramienta fundamental para el sexado de los especímenes muestreados, por consiguiente para la determinación de la proporción sexual de los individuos de tortuga

Carey inmaduros de las áreas de forrajeo de la Bahía de Jiquilisco, debido a que provee de resultados claros y concisos con un alto porcentaje de efectividad para la medición de testosterona plasmática brindando resultados confiables y reduciendo el margen de error al momento del análisis de los datos.

En el estudio de Allen *et al* (2015), se obtuvo una proporción sexual estimada de 3.5:1 Hembras/Machos en la población forrajera de tortugas verdes en la Bahía de San Diego, Estados Unidos. Mientras que en el presente estudio se obtuvo una proporción de 5.8:1 hembra/macho por lo que se tiene una parcialización de tortugas hembra en la población de tortugas Carey inmaduras en Bahía de Jiquilisco, es importante determinar la variación de la proporción sexual entre diferentes especies y poblaciones para determinar si existe una diferencia significativa en cuanto a la variación entre proporciones, poblaciones, para la comprensión de la dinámica reproductiva de la especie.

4.2 Cuantificación de concentración de testosterona (pg/ml)

Tabla 2. Datos estadísticos para la variable concentración de testosterona en tortugas Carey inmaduras.

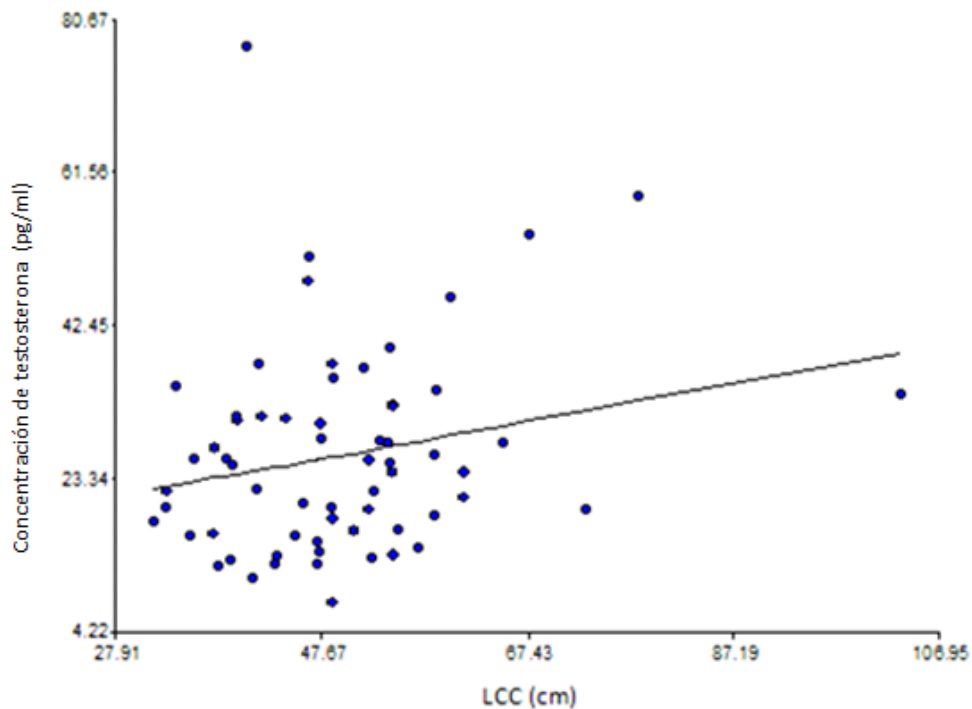
Sexo	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
Desconocido	2	167.5	76.65	113.3	221.7	167.5
Hembra	64	26.25	12.69	7.7	77.2	24.55
Macho	11	1671.16	853.2	660.3	3743.5	1622.8

Según Allen (2015) las hembras de tortuga verde inmaduras el rango de concentración de testosterona es de 4.1–113.1 pg/ml y en machos inmaduros es 198.4–2,613.0 pg/ml; mientras que para hembras maduras el rango de concentración de testosterona es de 4.6–281 pg/ml, y en machos 112.4–112,094.2pg/ml.

En el caso de la tortuga Carey de la zona forrajera de la Bahía de Jiquilisco, los valores de testosterona de hembras inmaduras tuvieron una variación de 7.7–77.20 pg/ml con una media de 26.24 pg/ml. Mientras que los machos inmaduros presentaron una variación entre 660.30–3083.20 pg/ml con una media de 1671.16 pg/ml. Es importante establecer los valores de referencia de la concentración de testosterona plasmática para las diferentes especies, estos datos son de utilidad como indicador de salud y para la determinación del sexo de los especímenes.

4.3 Relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.

Figura 1. Relación entre concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.

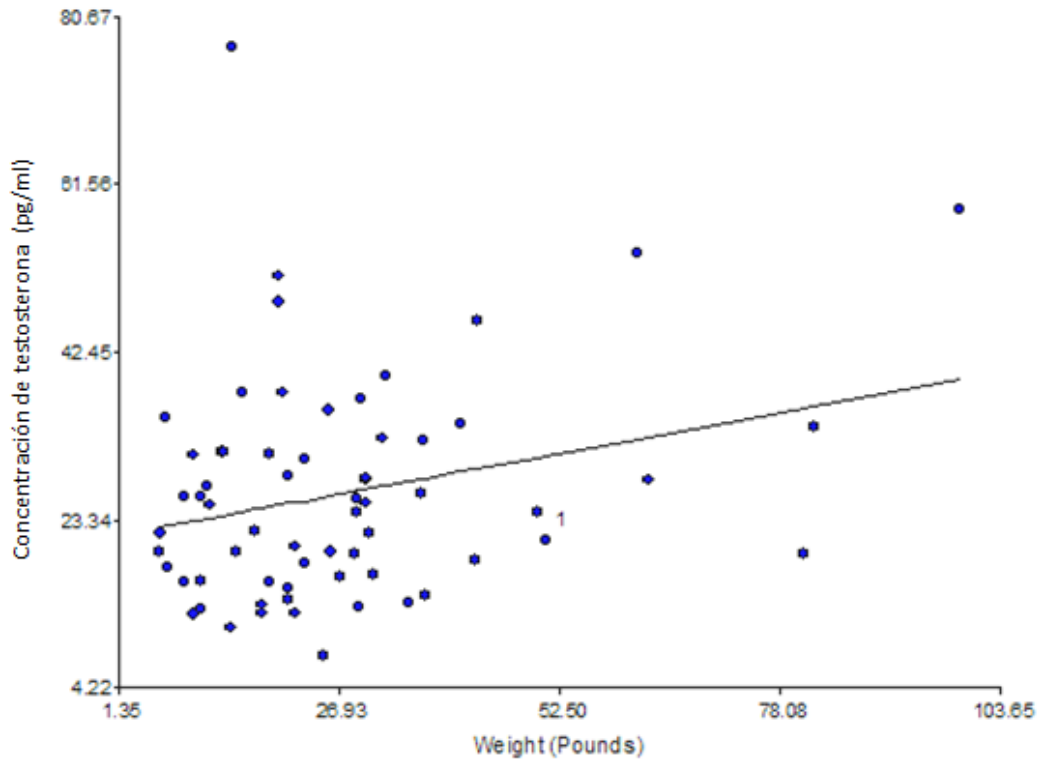


Interpretación: Estadísticamente no existe una relación significativa entre la concentración de testosterona y el largo curvo de caparazón de tortugas hembras, con un nivel de confianza del 5%. La probabilidad ($p=0.783$) es mayor a 0.05 por lo que cual se rechaza la hipótesis que las variables están relacionadas en forma lineal. Solamente 5% de la variación de la concentración de testosterona esta explicada por el largo curvo de caparazón (Ver anexos tabla A-4, tabla A-5 y tabla A-6).

Según estos resultados la variable largo curvo de caparazón no tienen relación respecto a la concentración de testosterona, siendo una medida poco confiable para ser considerada representativa al momento del sexado de un individuo inmaduro.

4.4 Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas hembra.

Figura 2. Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas hembra.

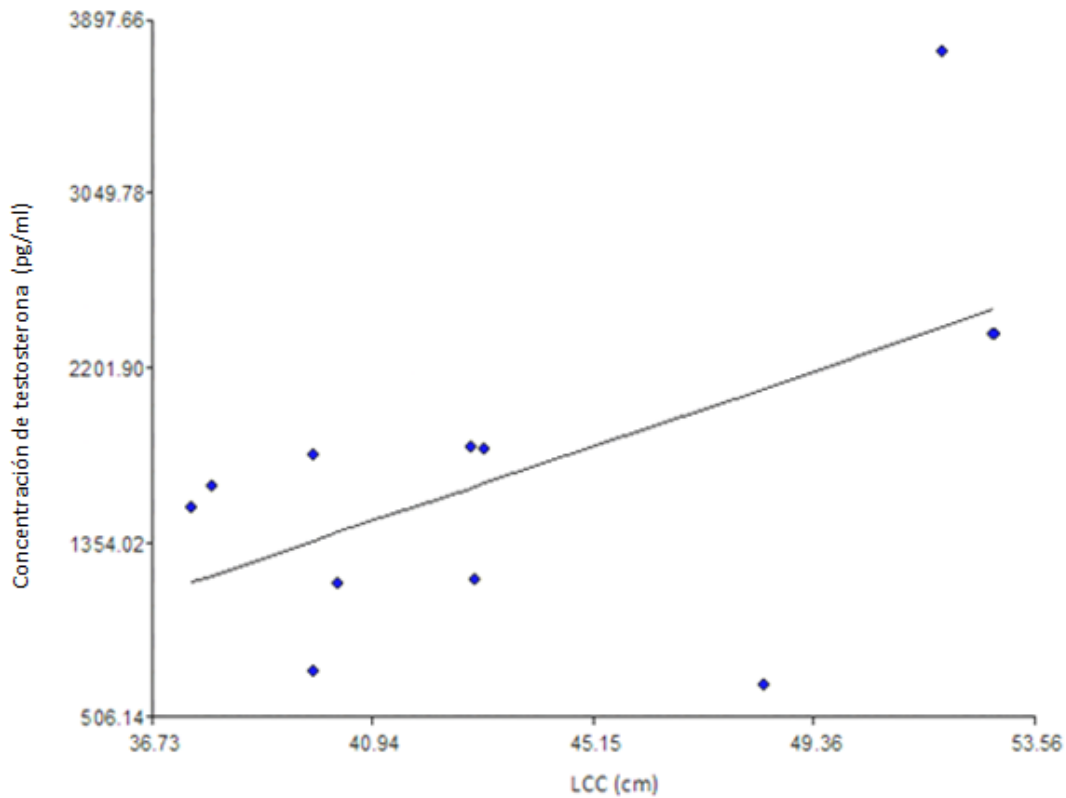


Interpretación: Estadísticamente no existe una relación significativa entre la concentración de testosterona y el peso de tortugas hembras, con un nivel de confianza del 5%. La probabilidad ($p=0.741$) es mayor a 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis que las variables están relacionadas en forma lineal. Solamente 7% de la variación de la concentración de testosterona está explicada por el peso del individuo (Ver anexos tabla A-7, tabla A-8 y tabla A-9).

Según estos resultados la variable de peso no tiene relación respecto a la concentración de testosterona, siendo una medida poco confiable para ser considerada representativa al momento del sexado de un individuo inmaduro.

4.5 Relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho.

Figura 3. Relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho.

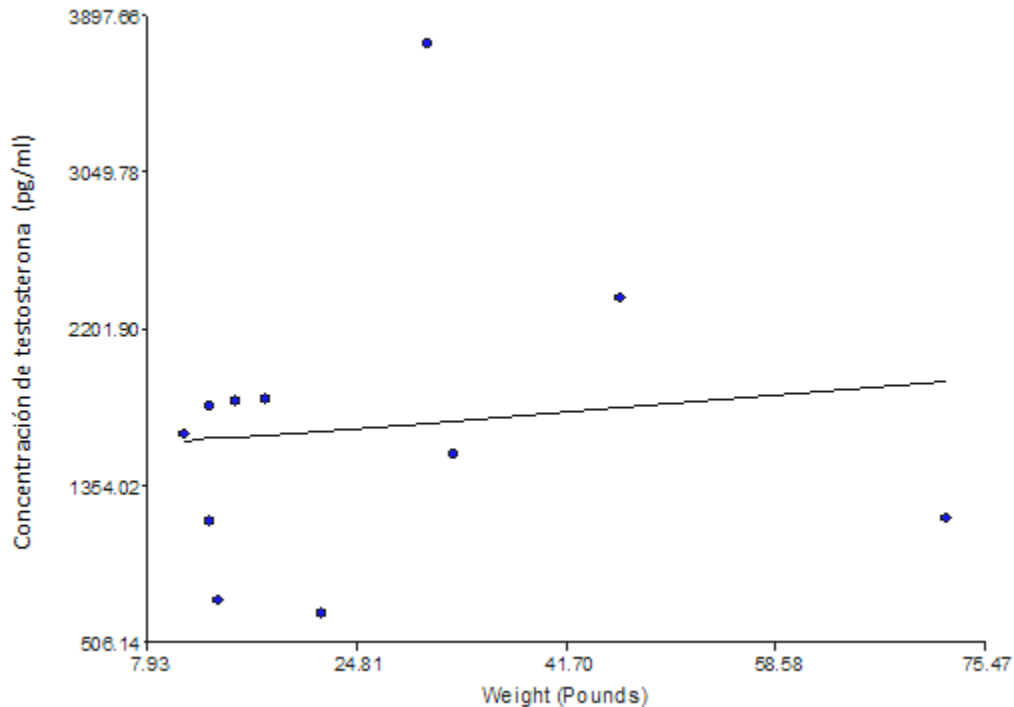


Interpretación: Estadísticamente no existe una relación significativa entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho, con un nivel de confianza del 5%. La probabilidad ($p=0.0847$) es mayor a 0.05 por lo que cual se rechaza la hipótesis que las variables están relacionadas en forma lineal. Solamente 29% de la variación de la concentración de testosterona esta explicada por el largo curvo de caparazón (Ver anexos tabla A-10, tabla A-11 y tabla A-12).

Según estos resultados la variable largo curvo de caparazón de tortugas macho no tiene relación respecto a la concentración de testosterona en los machos, siendo una medida poco confiable para ser considerada representativa al momento del sexado de un individuo inmaduro.

4.6 Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas macho.

Figura 4. Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas macho.



Interpretación: Estadísticamente no existe una relación significativa entre la concentración de testosterona y peso de tortugas macho, con un nivel de confianza del 5%. La probabilidad ($p=0.7382$) es mayor a 0.05 por lo que cual se rechaza la hipótesis que las variables están relacionadas en forma lineal. Solamente 1% de la variación de la concentración de testosterona esta explicada por el peso (Ver anexos tabla A-13, tabla A-14 y tabla A-15).

Según estos resultados la variable peso de las tortugas macho no tiene relación respecto a la concentración de testosterona, siendo una medida poco confiable para ser considerada representativa al momento del sexado de un individuo inmaduro.

5. Conclusiones.

La proporción sexual de las tortugas Carey inmaduras de la Bahía de Jiquilisco se encuentra sesgada hacia las hembras (5:1). Por ello es necesario establecer la variación de la proporción sexual de tortugas Carey natural, así como las variaciones entre las diferentes poblaciones y especies, conocer este aspecto de la biología de las especies es importante para la determinación de su éxito reproductivo.

En El Salvador, este es el primer estudio en relación a proporción sexual de la población juvenil de tortuga Carey de la Bahía de Jiquilisco, siendo información vital para inferir el estado de la población y sobrevivencia de cada sexo de la especie en las zonas de alimentación.

Los escenarios de cambio climático indican que el problema de la feminización casi completa para ciertas poblaciones de diferentes especies de tortugas marinas podría ocurrir dentro de los próximos diez a quince años, por lo que el monitoreo de las variaciones de la proporción sexual es crucial, ya que esta información puede ser de carácter predictivo en relación a las amenazas de cambio climático y conservación de la especie.

La técnica de ELISA es una opción segura para la cuantificación de testosterona en tortugas marinas inmaduras, debido a que es una técnica poco invasiva y que reduce los costos de investigación en comparación de otras técnicas que requieren mayor uso de recursos para su ejecución en campo.

El uso de parámetros morfométricos en relación a la medición de testosterona en individuos inmaduros no es un método confiable para la determinación de sexo de individuos inmaduros de tortuga Carey, debido a que no se encuentran relacionados entre sí por lo que es recomendable el uso de otros métodos que puedan proporcionar información significativa, como la medición de concentración de testosterona.

6. Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos, es importante evaluar de forma constante si existe una variación significativa de la proporción sexual de tortugas carey juveniles en las zonas forrajeras de la bahía de Jiquilisco durante diferentes períodos de tiempo con el fin de comprender una parte de la dinámica reproductiva en este estadio de la especie y aportar más datos que en el futuro puedan ser de provecho para la comunidad científica y los programas de conservación.

Realizar este estudio en tortugas Carey que se encuentren en los diferentes estadios de crecimiento con el fin de obtener las diferentes variaciones que ocurren el transcurso de la vida de esta especie y con ello dar lugar a futuras investigaciones sobre reproducción y salud reproductiva, así como para comprender la demografía y dinámica reproductiva de las poblaciones de vida silvestre con el fin de optimizar las estrategias de conservación para las especies amenazadas y en peligro crítico de extinción.

El uso de la prueba de ELISA para tortugas marinas ampliará sustancialmente la aplicación de análisis de la proporción de sexos para diferentes especies en áreas de alimentación, su uso también podría proporcionar información sobre la madurez sexual, estatus y salud reproductiva de una población.

El uso la técnica de ELISA en investigaciones en las que se realice cuantificación de testosterona en poblaciones de tortugas marinas, serán de utilidad para el respaldo y validación de la misma, esto dará lugar al posible uso de la técnica para la cuantificación de otras hormonas de importancia en estas especies.

7. Bibliografía.

Al-Hasbi AA, Alkindi AY, Mahmoud IY, Owens DW, Khan T, Al-Abri A. 2006. Plasma hormone levels in the green turtles *Cheloniemydas* During peak period of nesting at Ras Al-Hadd Oman. Journal of endocrinology. Volumen 191. 9-14 pp.

Allen CD, Robbins MN, Eguchi T, Owens DW, Meylan AB, Meylan PA, et al. 2015 First Assessment of the Sex Ratio for an East Pacific Green Sea Turtle Foraging Aggregation: Validation and Application of a Testosterone ELISA. PLoS ONE 10(10)

Blanvillain G, Owens DW, Kuchling G. 2011. Hormones and reproductive cycles in turtles. Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 3-Reptiles. Elsevier Inc. 277–303 pp.

Broderick AC, Godley BJ, Reece S, Downie JRR. 2000 Incubation periods and sex ratios of green turtles: highly female biased hatchling production in the eastern Mediterranean. Mar EcolProg Ser; 202: 273–281 pp. doi: 10.3354/meps202273

Chacon-Chaverri D. 2004. Tortugas Carey del Caribe; biología, distribución y estado de conservación. Programa de conservación de las tortugas marinas de América Latina y el Caribe del Fondo mundial para la Naturaleza (WWF). Publicación No. 1

Chard T. 1990. An Introduction to Radioimmunoassay & Related Techniques 4th Ed, AmsterdamElsevier

Chaloupka k, Musick P, Snover P.2012 Status of the hawksbill turtle (*Eretmochelysimbricata*) in the Caribbean region. ChelonianConservBiol 3: 177–184

Campbell, C.L. 2014. Estado de Conservación de la Tortuga Carey en las Regiones del Gran Caribe, Atlántico Occidental y Pacífico Oriental. Secretaría *Pro Tempore* CIT, Virginia USA. 76p

CITES, Internacional. 2010. Apéndices I, II y III (En vigor a partir del 24 de junio de 2010).
CITES

Dick B, 2005. La Tortuga Carey. Secretaría Pro Tempore de la Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas (CIT), San José, Costa Rica Publicación No. 1

Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois F, Donnelly M (Editors). 1999. Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.

Gaos, AR., Abreu-Grobois, FA., Alfaro-Shigueto J., Amorocho, D., Arauz, R., Baquero, R., Duenas, C., Hasbun, C., Liles, M., Mariona, G., Muccio, C., Munoz, J.P., Nichols, W.J., Pena, M., Seminoff, J.A., Vasquez, M., Urteaga, J., Wallace, B., Yañez, I.L., Zarate, P., 2010. Signs of hope in the eastern Pacific: international collaboration reveals encouraging status for a severely depleted population of hawksbill turtles *Eretmochelysimbricata*. *Oryx* 44, 595–601.

Gaos, A.R., Lewison, R.L., Wallace, B.P., Yañez, I.L., Liles, M.J., Nichols, W.J., Baquero, A., Hasbun, C.R., Vasquez, M., Urteaga, J., Seminoff, J.A., 2012. Spatial ecology of critically endangered hawksbill turtles *Eretmochelysimbricata*: implications for management and conservation. *Marine Ecology Progress Series* 450, 181–198

Gaos, A. R., M. J. Liles, V. Gadea, A. Peña de Niz, F. Vallejo, C. Miranda, J. J. Darquea, A. Henríquez, E. Altamirano, A. Rivera, S. Chavarría, D. Melero, J. Urteaga, C. M. Pacheco, D. Chácon, C. LeMarie, J. Alfaro-Shigueto, J. C. Mangel, I. L. Yañez, and J. A. Seminoff. 2017. Living on the edge: hawksbill nesting and conservation along the eastern Pacific rim. *Latin American Journal of Aquatic Research* 45:572–584.

Jandres MV, Liles M, Mariona GI, Segovia JV. 2008. Conservación y recuperación de la tortuga Carey (*Eretmochelysimbricata*) del pacífico oriental, el caso de El Salvador. *El Salvador ciencia y tecnología*. Volumen 13 (18). 1-12 pp

Lande R. 1988 Sep. Genetics and demography in biological conservation. Science New York. Volumen 241 (4872). 1455-1460 pp

Leon YM, Diez CE. 1999. Dec. Population structure of Hawksbill turtles on a foraging ground in the Dominican Republic. Chelonian conservation and biology. Volumen 3 (2). 230-236 pp.

Liles MJ., Jandres, MV., Lopez, WA., Mariona, GI., Hasbun, CR., & Seminoff JA. 2011. Hawksbill turtles (*Eretmochelysimbricata*) in El Salvador: Nesting distribution and mortality at the largest remaining nesting aggregation in the Eastern Pacific Ocean. Endang. Species Res. 14, 23-30. (doi: 10.3354/esr 00338)

Liles MJ, Peterson JM, Lincoln YS, Seminoff JA, Gaos AR, Peterson TR. 2014 Apr. Connecting international priorities with human wellbeing in low-income regions: lessons from hawksbill turtle conservation in El Salvador. Local Environment: The international journal of justice and sustainability. Volumen 20. 1383- 1404 pp.

Liles, MJ. Peterson, MJ. Lincoln, YS. Seminoff, JA. Gaos, AR. Peterson, TR. 2015. Connecting international priorities with human wellbeing in low-income regions: lessons from hawksbill turtle conservation in El Salvador, Local environment, 20:11, 1383-1404, (DOI: 10.1080/13549839.2014.905516)

Liles, M. J., T. R. Peterson, J. A. Seminoff, A. R. Gaos, E. Altamirano, A. V. Henríquez, V. Gadea, J. Urteaga, B. P. Wallace, and M. J. Peterson. 2019. Potential limitations of behavioral plasticity and the role of egg relocation in climate change mitigation for a thermally sensitive endangered species. EcoEvol. 2019; 9: 1603-1622. <https://doi.org/10.1002/ece3.4774>

Marcovaldi MA, Santos JB, Santos A, Soares LS, Lopez GG, Godfrey MH, Mendilaharsu M, Fuentes MP. 2014 Jun- Jul. Spatio-temporal variation in the incubation duration and

sex ratio of hawksbill hatchlings: implication for future management. *Journal of thermalbiologyElsevier*. Volumen 44. 70-77 pp

MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2013a. Propuesta del plan de manejo actualizado para el periodo 2012–2017 del Área de Conservación Bahía de Jiquilisco. MARN, San Salvador, El Salvador.

MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2013b. Resultados de las actividades para la conservación de las tortugas marinas en El Salvador en 2012. San Salvador: MARN.

Mrosovsky N, Hopkins-Murphy SR,Richardson JI. 1984 Aug. Sex Ratio of sea turtles: seasonal change. *Science New York*. Volumen 225 (4663). 739-741 pp

Mrosovsky N. 1994. Sex ratios of sea turtles. *The journal of experimental zoology*. Volumen 270. 16-27 pp.

Sillman R, Vargas I, Troëng S. 2002. Tortugas Marinas Guiaeducativa. Caribbean conservation corporation. Publication No 2

Owens DW, Hendrickson JR, Lance V, Callard IP. 1978 Sep. A technique for determining sex of immature *Cheloniemydas* using a Radioimmunoassay. *Herpetologists´ League*. Volumen 34 (3). 270-273 pp.

Owens DW&Morris YA 1985.The comparative endocrinology of sea turtles.*Copeia*Volumen 3 723–735 pp.

Owens DW. 1997. Hormones in the life history of sea turtles. *The biology of sea turtles*. CRC Press

Wallace, B.P., DiMatteo, A.D., Hurley, B.J., Finkbeiner, E.M.,Bolten, A.B., Chaloupka, M.Y., Hutchinson, B.J., Abreu-Grobois, F.A., Amorocho, D., Bjorndal, K.A., Bourjea, J.,

Bowen, B.W., Briseño-Dueñas, R., Casale, P., Choudhury, B.C., Costa, A., Dutton, P.H., Fallabrino, A., Girard, A., Girondot, M., Godfrey, M.H., Hamann, M., López- Mendilaharsu, M., Marcovaldi, M.A., Mortimer, J.A., Musick, J.A., Nel, R., Pilcher, N.J., Seminoff, J.A., Troëng, S., Witherington, B., Mast, R.B., 2011. Regional Management Units for marine turtles: a novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. PLoSOne 5, e15465. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015465>.

Wibbels T. 2003. Critical approaches to sex determination in sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken J, editors. *The Biology of Sea Turtles Volume II*. CRC Press; 103–134 pp.

Wyneken, J. 2004. *La anatomía de las Tortugas marinas*. U.S. Department of commerce. NOAA TechnicalMemorandum NMFS-SEFSC-470, 84-85 pp.

8. Anexos

Figura A-1. Ciclo de vida de las tortugas marinas.

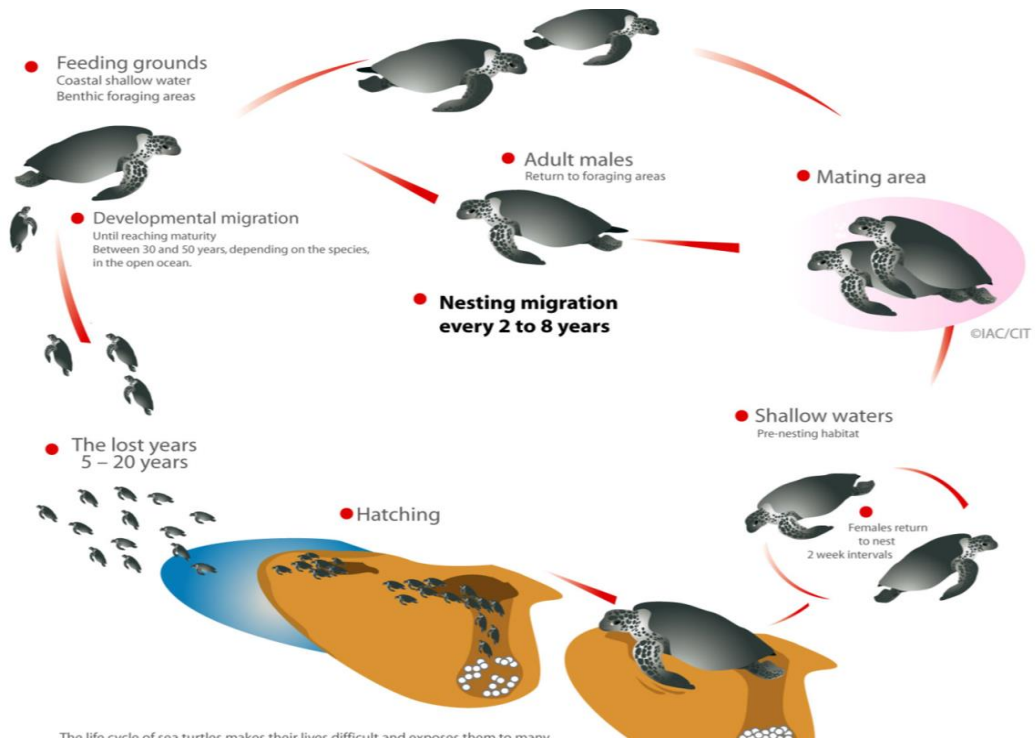


Figura A-2. Características morfológicas de la tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*)

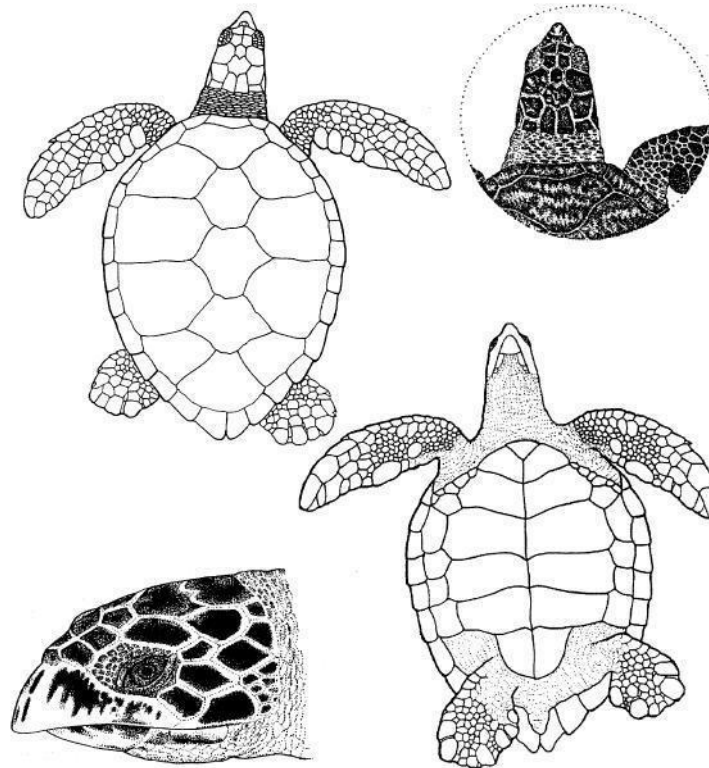


Figura A-3. Mapa de ubicación de población forrajera de tortuga Carey en Bahía de Jiquilisco.



Figura A-4. Tortuga macho y hembra, sexado por observación de características sexuales secundarias en las que se aprecia la proyección de la cola del macho en el borde de los escudos marginales del caparazón.

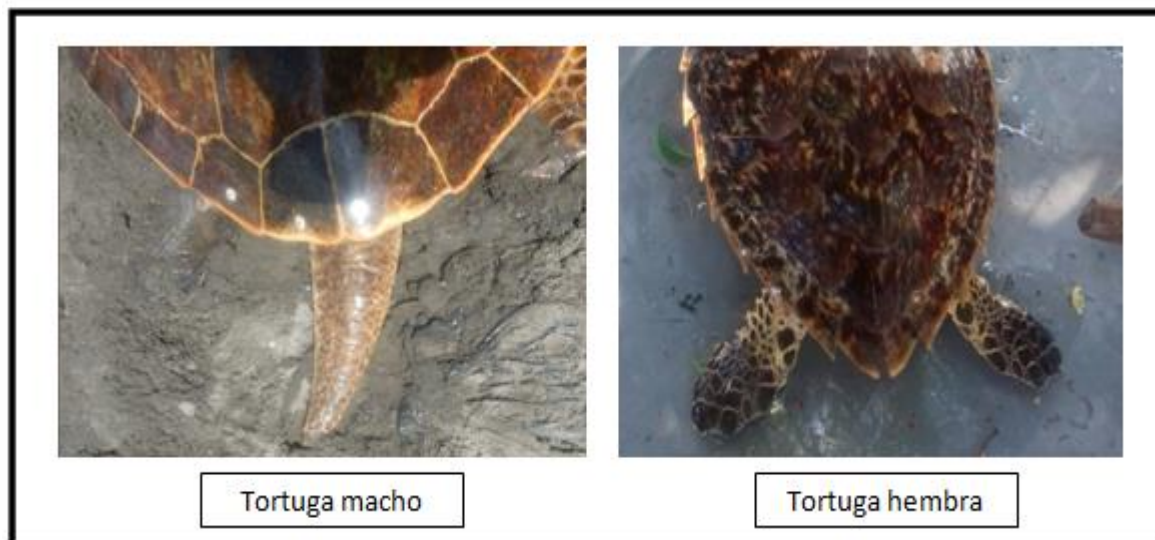


Figura A-5. Anatomía de tortuga Boba hembra inmadura

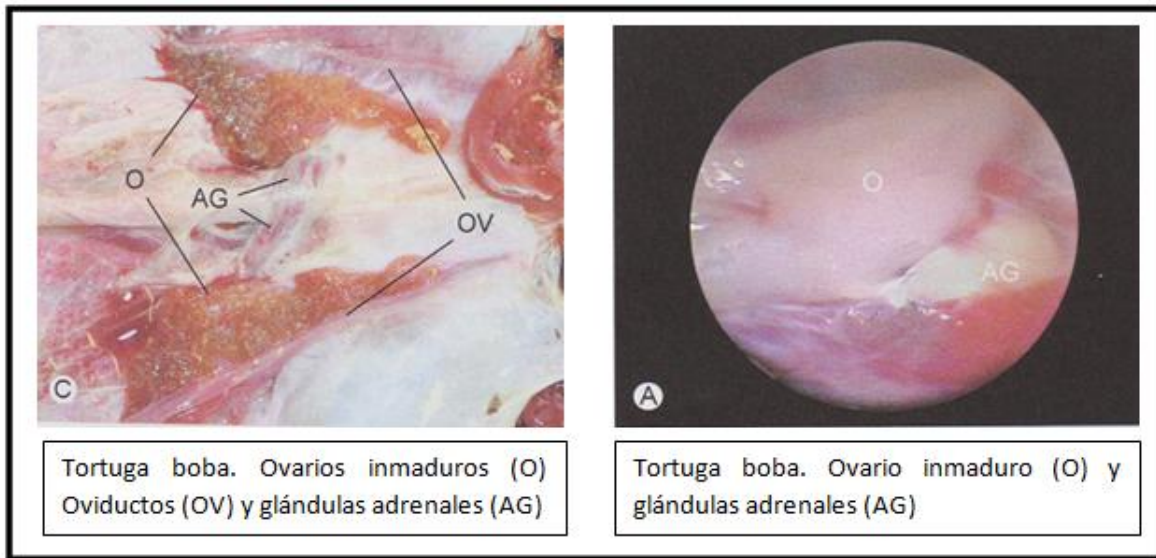


Figura A-6. Anatomía de tortuga Verde y tortuga Boba macho inmadura

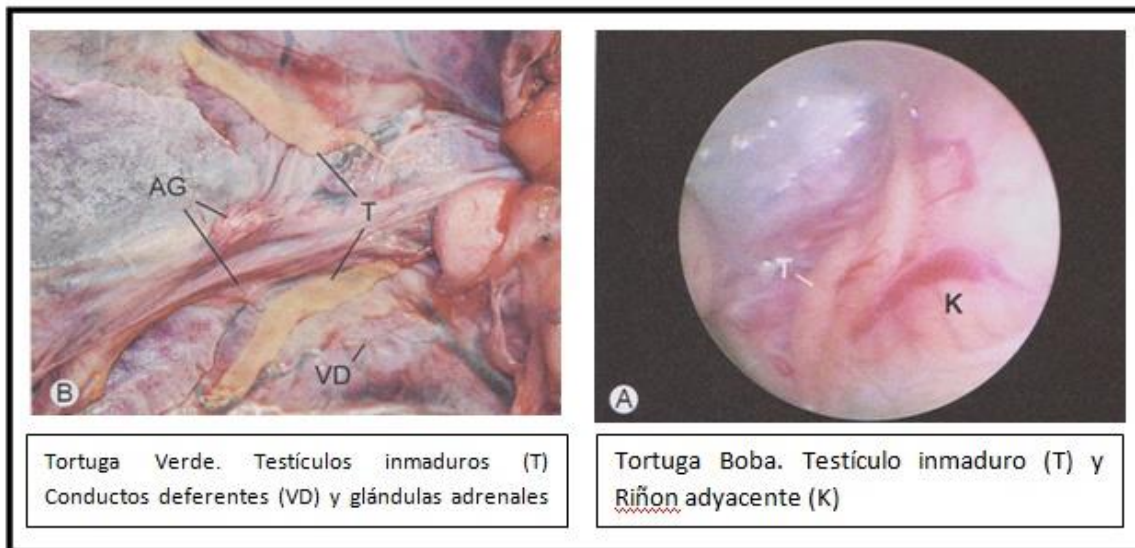


Figura A-7 Variación estacional de la concentración de testosterona (T) de machos maduros e inmaduros de tortuga Boba, en relación a su comportamiento reproductivo (Blanvillain *et al* 2008).

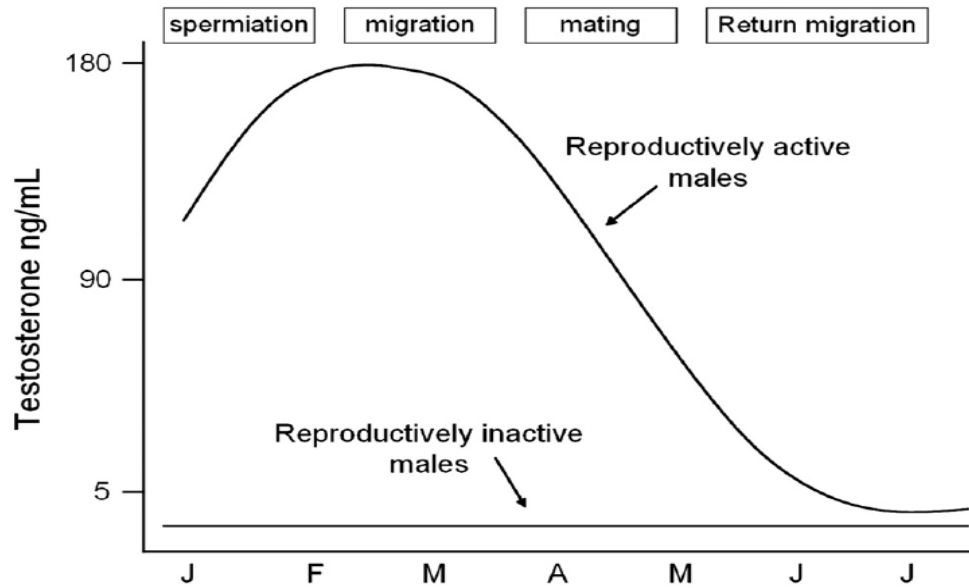


Figura A-8. Mapa de los sitios de captura para el estudio.



Figura A-9. Referencias anatómicas para la toma de medidas morfométricas de la región dorsal del caparazón (A). Referencia anatómica para la toma de medida morfométrica de la cola (B).

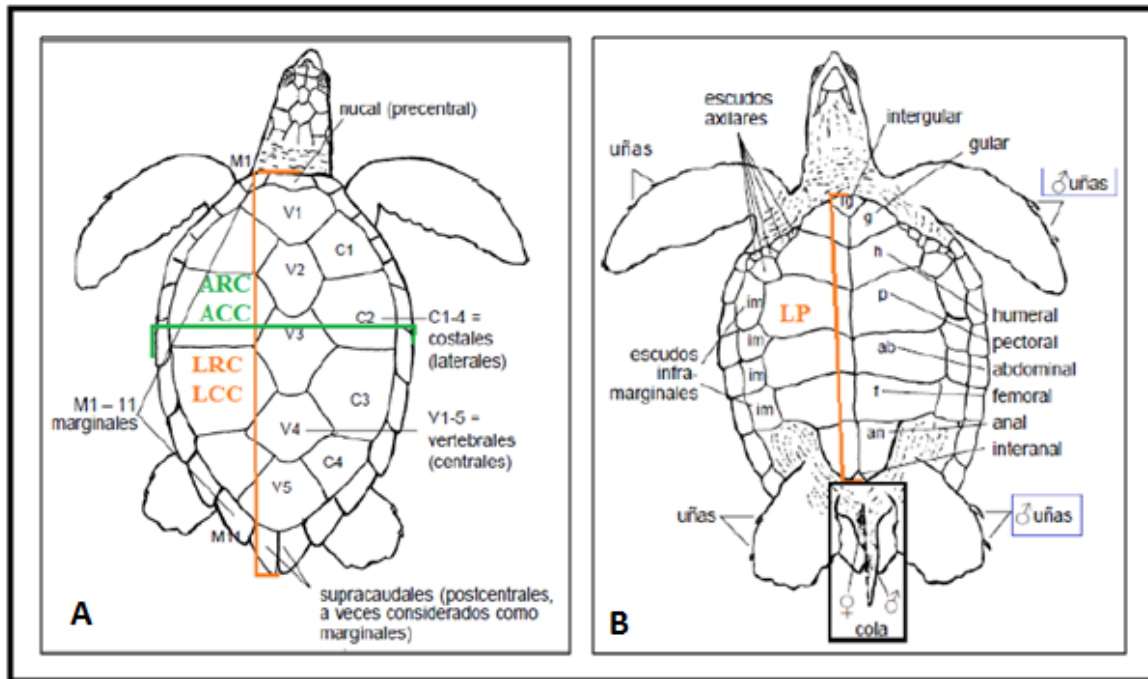


Figura A-10. Vista dorsal de las venas yugulares externas (A). Extracción de muestra sanguínea (B).

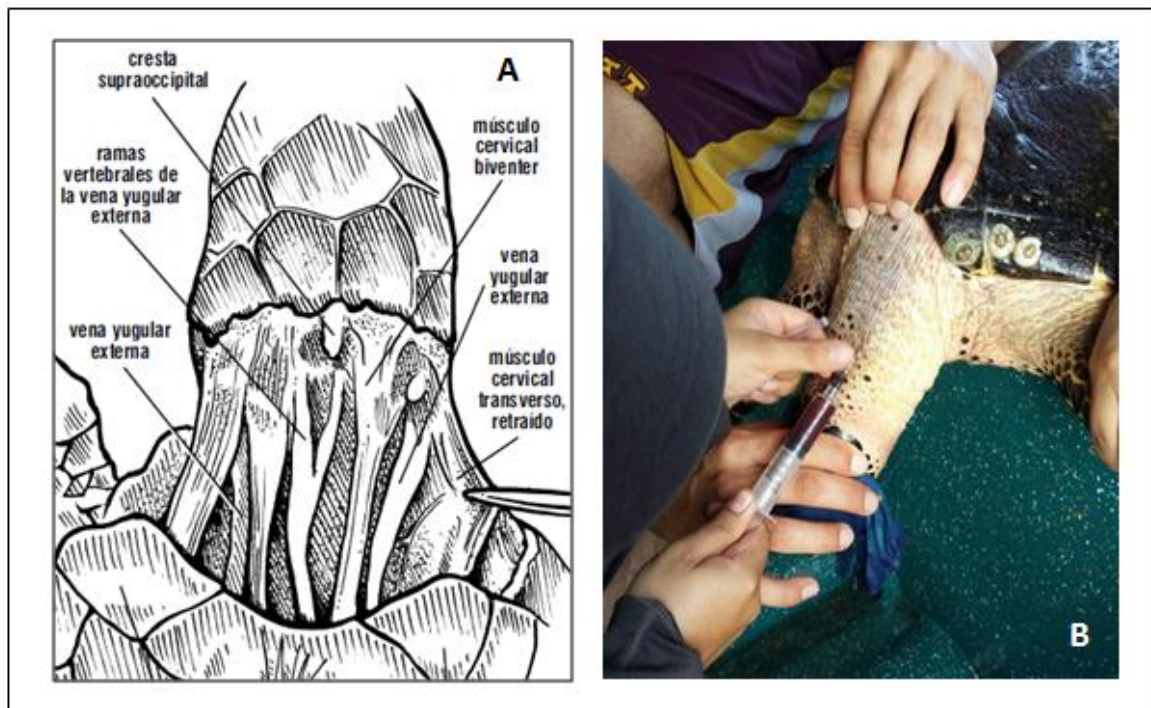


Figura A-11. Muestras de plasma sanguíneo (A). Contenedor de nitrógeno líquido para la conservación de muestras (B).

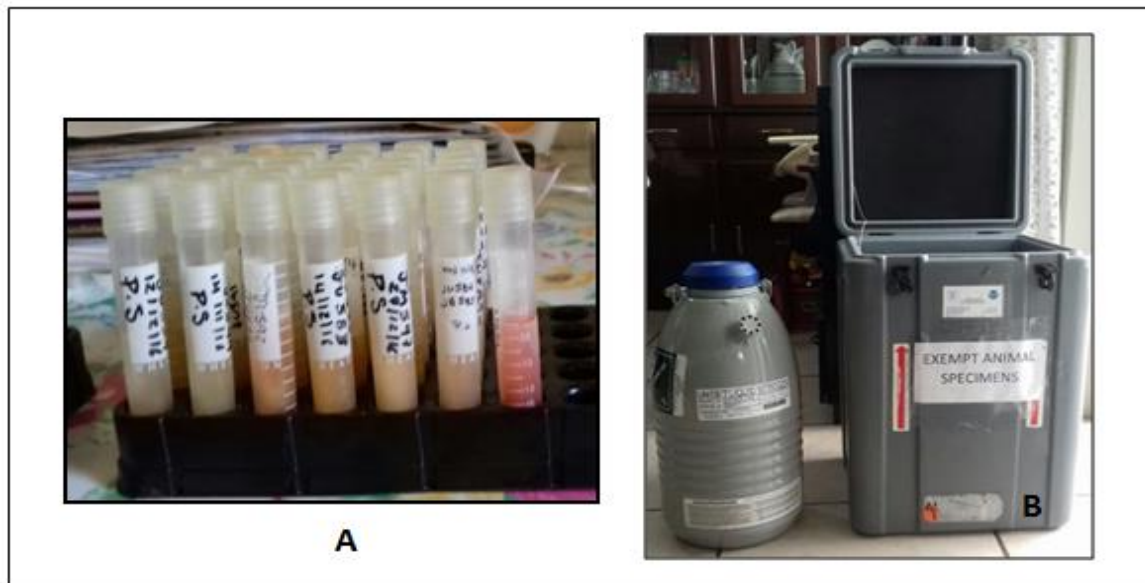


Figura A-12. Esquema del proceso de ELISA competitivo

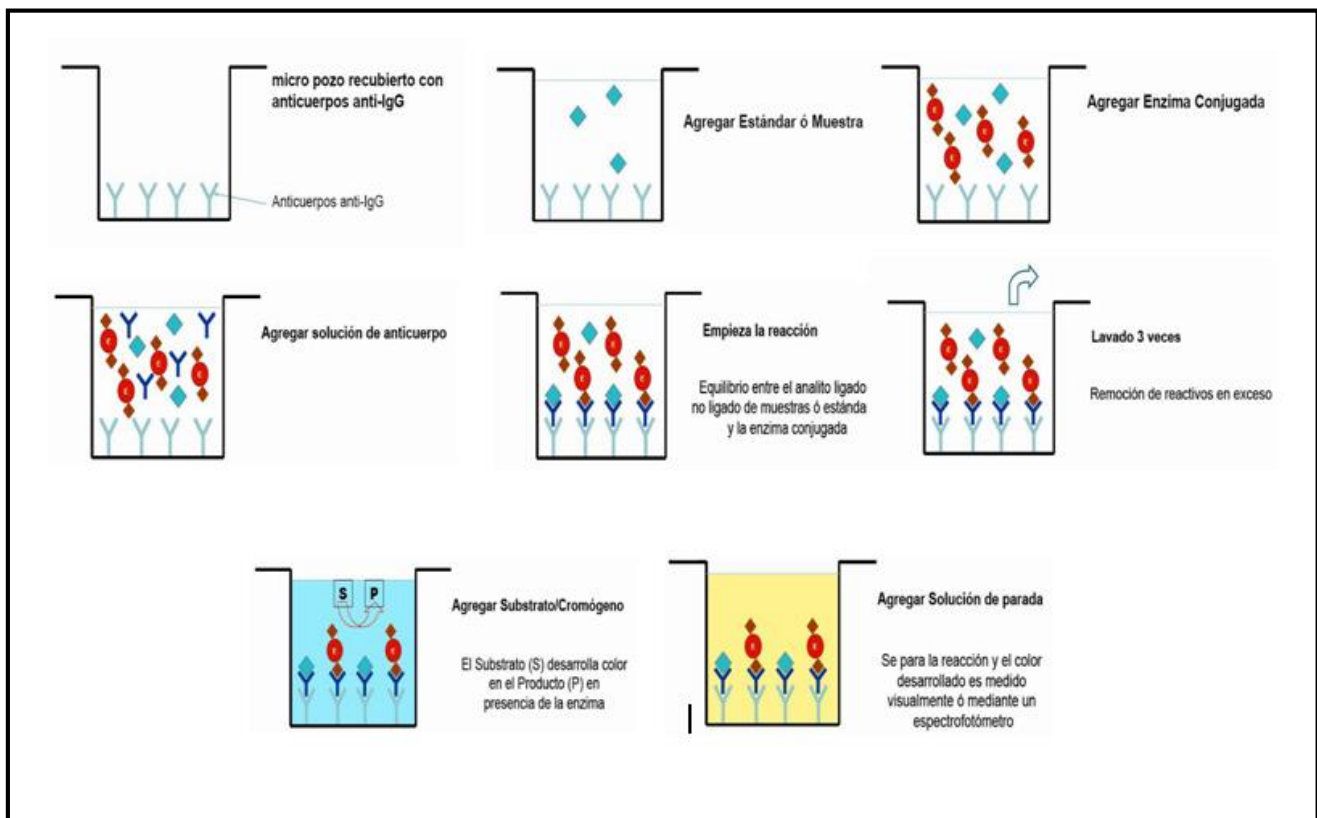


Figura A-13. Representación gráfica de proporción sexual. Representación gráfica de los resultados en que del 100% de la población muestreada un 83.12% corresponde a hembras, el 14.29% corresponde a machos mientras que el 2.60% es desconocido.

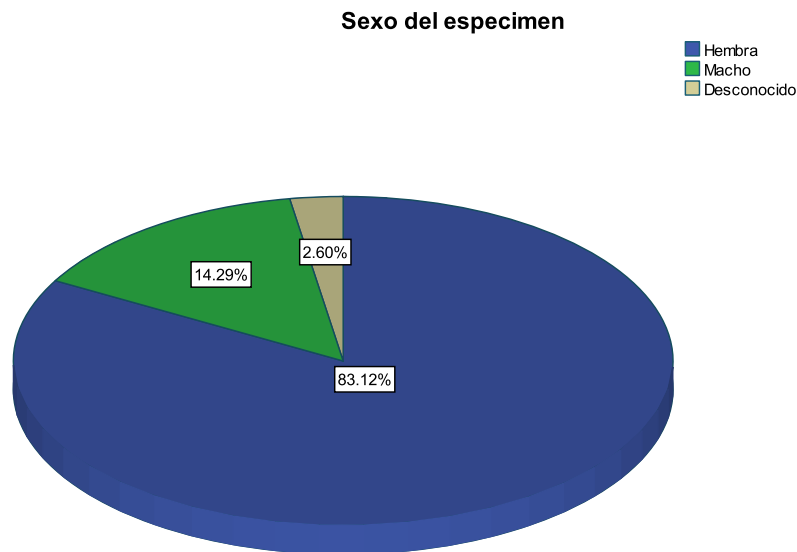


Tabla A-1. Tabla resumen de datos morfométricos para hembras juveniles, en el que se presentan el número de muestras (n), desviación estándar (D.E), valor mínimo (min), valor máximo (Máx) y mediana.

Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
LCC (cm)	64	49.49	11.84	31.5	103.36	48.67
ACC (cm)	64	41.02	9.01	26.5	73.06	40.1
Largo de cola (cm)	64	6.04	1.38	3	10.9	6
Peso (lb)	64	27.17	18.55	6	99	22.5

Tabla A-2. Tabla resumen de datos morfométricos para machos juveniles, en el que se presentan el número de muestras (n), desviación estándar (D.E), valor mínimo (min), valor máximo (Máx) y mediana.

Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
LCC (cm)	11	43.38	5.35	37.5	52.8	42.8
ACC (cm)	11	35.88	3.23	32.2	41.97	35.06
Largo de cola (cm)	11	5.15	1.41	3	8.6	5.2
Peso (lb)	11	26.09	18.82	11	72.4	17.5

Tabla A-3. Tabla resumen de datos morfométricos para individuos con sexo desconocido en el que se presentan el número de muestras (n), desviación estándar (D.E), valor mínimo (min), valor máximo (Máx) y mediana.

Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
LCC (cm)	2	64.03	28.1	44.16	83.9	64.03
ACC (cm)	2	53.15	23.36	36.63	69.67	53.15
Largo de cola (cm)	2	6.4	0.42	6.1	6.7	6.4
Peso (lb)	2	76	69.3	27	125	76

Tabla A-4. Análisis de regresión lineal para la relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra en la que se presenta el coeficiente de determinación (R^2).

Variable	N	R^2
Concentración de testosterona	64	0.05

Tabla A-5. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados para la relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra, en la que se presenta el valor estimado (Est), error estimado (E.E), límites de confianza inferior (LI) límite de confianza superior (LS) y estadístico de prueba (T).

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor
Testosterona	14.49	6.75	0.99	27.98	2.15	0.0359
ACC(cm)	0.24	0.13	-0.03	0.5	1.79	0.0783

Tabla A-6. Análisis de varianza. Para la relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra, en la que se presenta la suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl) cuadrados medios (CM), estadístico teórico (F)

Análisis de varianza	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	498.65	1	498.65	3.21	0.0783
SCL (cm)	498.65	1	498.65	3.21	0.0783
Error	9646.25	62	155.58		
Total	10144.9	63			

Tabla A-7. Análisis de regresión lineal para la relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas hembra en la que se presenta el coeficiente de determinación (R^2).

Variable	N	R^2
Concentración de testosterona	64	0.07

Tabla A-8. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados para la relación entre la concentración de testosterona y peso tortugas hembra en la que se presenta el valor estimado (Est), error estimado (E.E), límites de confianza inferior (LI) límite de confianza superior (LS) y estadístico de prueba (T).

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor
Testosterona	21.32	2.75	15.82	26.81	7.76	<0.0001
Weight (Pounds)	0.18	0.08	0.01	0.35	2.17	0.0741

Tabla A-9. Cuadro de análisis de varianza. Para la relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra en la que se presenta la suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl) cuadrados medios (CM), estadístico teórico (F).

Análisis de varianza	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	714.01	1	714.01	4.69	0.0341
Weight (Pounds)	714.01	1	714.01	4.69	0.0341
Error	9430.89	62	152.11		
Total	10144.9	63			

Tabla A-10. Análisis de regresión lineal para la relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho en la que se presenta el coeficiente de determinación (R^2).

Variable	N	R^2
Concentración de testosterona	11	0.29

Tabla A-11. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados para la relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho en la que se presenta el valor estimado (Est), error estimado (E.E), límites de confianza inferior (LI) límite de confianza superior (LS) y estadístico de prueba (T).

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
Testosterona	-2080.99	1950.56	-6493.45	2331.48	-1.07	0.3138
SCL (cm)	86.5	44.66	-14.53	187.53	1.94	0.0847

Tabla A-12. Análisis de varianza. Para la relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho en la que se presenta la suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl) cuadrados medios (CM), estadístico teórico (F).

Análisis de varianza	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2141643.64	1	2141643.64	3.75	0.0847
SCL (cm)	2141643.64	1	2141643.64	3.75	0.0847
Error	5137850.1	9	570872.23		
Total	7279493.75	10			

Tabla A- 13. Análisis de regresión lineal para la relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas macho en la que se presenta el coeficiente de determinación (R^2).

Variable	N	R^2
Concentración de testosterona	11	0.01

Tabla A-14. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados para la relación entre la concentración de testosterona y peso tortugas macho en la que se presenta el valor estimado (Est), error estimado (E.E), límites de confianza inferior (LI) límite de confianza superior (LS) y estadístico de prueba (T).

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor
const	1536.13	475.4	460.7	2611.56	3.23	0.0103
Weight (Pounds)	5.17	15.01	-28.78	39.13	0.34	0.7382

Tabla A-15. Análisis de varianza para la relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas macho en la que se presenta la suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl) cuadrados medios (CM), estadístico teórico (F).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	94870.88	1	94870.88	0.12	0.7382
Weight (Pounds)	94870.88	1	94870.88	0.12	0.7382
Error	7184622.87	9	798291.43		
Total	7279493.75	10			