

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DIRECCION DE INVESTIGACION**

Código: AV-2003

NOMBRE DE LA INVESTIGACIÓN.

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

Título a obtener: Licenciado(a) en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Autores.

Nombres, apellidos	Institución y Dirección	Teléfono y correo electrónico	Firma
Iris Marielos, Chavarría Pérez	Colonia Guadalupe pasaje Galán, casa # 2, San Marcos, San Salvador	marie_chavarria@yahoo.com 7347-3298	
Mauricio, Melara Soriano	Residencial Villa Constitución, polígono J1, Casa # 8, Nejapa, San Salvador	Mauri-vet@hotmail.com 7509-2534	
MVZ. Jorge Armando Castro Menjívar	Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Medicina Veterinaria, Final de Av. Mártires y Héroes del 30 de julio, San Salvador, El Salvador.	jorcel_uet@yahoo.com 2235-5416	
PhD. Michael Joseph Liles	Asociación Procosta, El Salvador	mliles@hawksbill.org 7729-3891	

Visto Bueno

Coordinador General de Procesos de Graduación del Departamento **Firma:**
MVZ. M Sp. María José Vargas Artiga

Director General de Procesos de Graduación de la Facultad **Firma:**
Ing. Agr. Enrique Alonso Alas García

Jefe del Departamento **Firma:**
MVZ. Ricardo Ernesto Gamero Guandique

Sello:

Lugar y fecha: Marzo de 2020

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

AUTORES: Chavarría-Pérez, I.M ⁽¹⁾, Melara Soriano, M ⁽¹⁾, Liles, M.J ⁽²⁾, Castro-Menjivar, J.A ⁽³⁾

RESUMEN

La determinación de proporción sexual de tortugas marinas en hábitats forrajeros es de gran interés para su conservación, estos individuos carecen de características sexuales secundarias, dificultando el sexado; por ello, el uso de técnicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la medición de testosterona, es importante para la investigación de vida silvestre. El estudio se realizó en la Bahía de Jiquilisco, Usulután, El Salvador entre los meses de agosto 2017 y febrero 2018. Se recolectaron 77 muestras sanguíneas tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*) juveniles de las que se extrajo plasma sanguíneo; las muestras fueron enviadas al laboratorio endocrinológico del Southwest Fisheries Science Center (SWFSC) de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) en La Jolla, California, Estados Unidos, para realizar la técnica de ELISA. En los resultados se demuestra una proporción sexual de tortugas Carey 5.8 hembras: 1 Macho. Los valores de concentración 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 no es confiable para el sexado de individuos inmaduros y que el uso de la técnica de ELISA de testosterona es una opción segura y confiable para la determinación de sexo en tortugas marinas inmaduras.

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

¹ Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Medicina Veterinaria, Estudiante tesista. Email: marie_chavarría@yahoo.com

¹ Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Medicina Veterinaria, Estudiante tesista. Email: mauri-vet@hotmail.com

² Iniciativa Carey del Pacífico Oriental (ICAPO), Docente Director. Email: mliles@hawksbill.org

³ Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Medicina Veterinaria, Docente Director. Email: jorcel_vet@yahoo.com

ABSTRACT

Determining sex ratios of sea turtles at foraging areas is an important parameter for conservation. Sea turtles do not exhibit external characteristics to distinguish sex in immature stages, hindering sexing. Thus, there has been a growing application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure testosterone concentration in blood plasma for wildlife research. The study was performed at feeding areas of Jiquilisco Bay, Usulután, El Salvador, from August 2017 to February 2018. Blood samples were obtained from 77 immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*), from which blood plasma was extracted. Samples were sent to the endocrinology laboratory from Southwest Fisheries Science Center (SWFSC) of the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) in La Jolla, California, United States, where the ELISA technique was performed. Results indicated a female bias (5.8 female: 1 male) among turtles in the foraging aggregation. The range of testosterone concentration values for immature females was 7.7-77.20 pg/ml, while immature males showed testosterone concentration values between 660.30-3083.20 pg/ml. There was no correlation between testosterone concentration and curved carapace length for neither females ($p=0.783$) nor males ($p=0.0847$). Likewise, there was no correlation between testosterone concentration and weight for neither females ($p=0.741$) nor males ($p=0.7382$). In conclusion, the use of morphometric parameters is not reliable for assign sex to immature hawksbill turtles and that the use of ELISA technique is a safe and reliable option to determining sex in immature sea turtles.

Key words: *Eretmochelys imbricata*, Sex ratio, Testosterone, ELISA, Feeding areas, Jiquilisco bay.

1. Introducción.

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 (Lande 1988) 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 (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).

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).

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 (Liles *et al.* 2011). 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 (Campbell 2014).

2. 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.

2.1 Metodología de campo

2.1.1 Captura de individuos

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; al capturar a la tortuga se procedió a levantarla y posicionarla en la lancha.

2.1.2 Extracción de muestra de Sangre

Las muestras de sangre fueron extraídas del seno cervical dorsal (Wyneken 2004). Para la recolección de la muestra se utilizaron tubos con heparina de litio con capacidad de 4 ml. Las muestras fueron trasladadas a la estación biológica ubicada en la isla de San Sebastián, 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.

2.2 Metodología de laboratorio.

Las muestras fueron enviadas al laboratorio endocrinológico del SWFSC de la NOAA para su procesamiento y análisis, 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

2.3 Metodología estadística.

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).

3. Resultados y discusión

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

En la siguiente tabla se muestra la distribución de los datos obtenidos correspondientes al número de hembras, machos y especímenes de sexo desconocidos.

Cuadro 1. Clasificación sexual de los especímenes de tortuga Carey muestreados en la bahía de Jiquilisco.

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

La proporción sexual de tortugas Carey inmaduras en la Bahía de Jiquilisco es de 5.8 hembras: 1 Macho. 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 este 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 Chaloupka *et al* (2012) (ver cuadro 1).

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 (Ver cuadro 2). 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.

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. Según Al-hasbi (2006) los rangos de concentración de testosterona entre machos y hembras son amplios; sin embargo, al mismo tiempo son bien diferenciados, esto es consistente con los resultados de este estudio así como el estudio de Allen en tortugas verde.

Cuadro 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 los resultados la variable largo curvo de caparazón no tienen relación respecto a la concentración de testosterona tanto para hembras (Figura 1) como para machos (Figura 2), siendo una medida poco confiable para ser considerada representativa al momento del sexado de un individuo inmaduro. Según Chacon-Chaverri (2004) y Eckert (1999) En individuos adultos el sexado de individuos 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, mientras que en individuos inmaduros estas características no han sido

desarrollados por lo que, esta práctica debe ser realizada con precaución en individuos que no hayan llegado a la madurez sexual

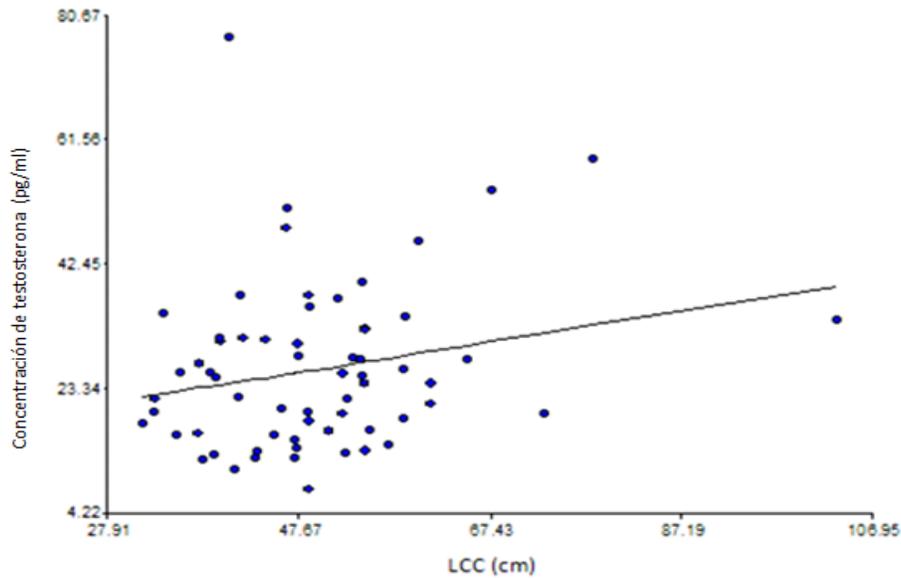


Figura 1. Relación entre concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra.

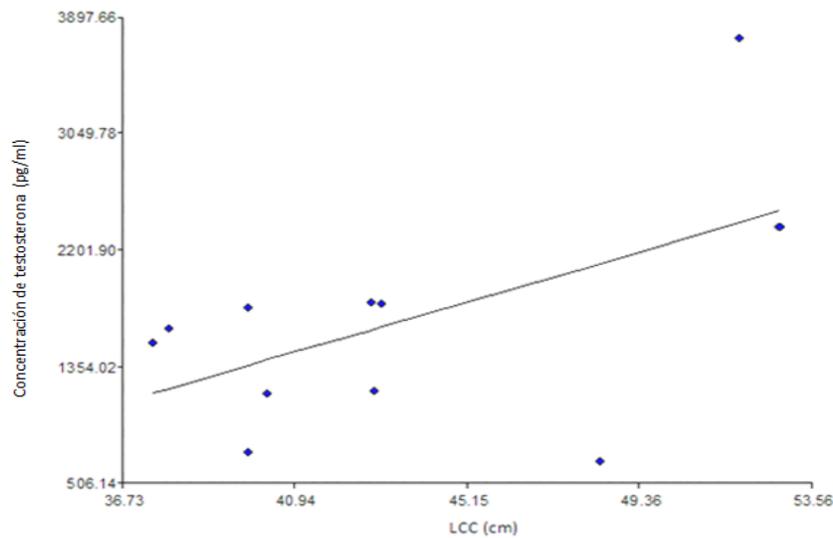


Figura 2. Relación entre la concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho.

Según estos resultados la variable de peso no tiene relación respecto a la concentración de testosterona tanto para hembras (Figura 3) como para machos (Figura 4), siendo una

medida poco confiable para ser considerada representativa al momento del sexado de un individuo inmaduro. Esto es congruente con lo mencionado por Blanvillain *et al.* (2011) En estadios inmaduros, no es posible determinar el sexo de las tortugas por características secundarias externas, además León (1999) aconseja llevar a cabo el sexado de individuos maduros con precaución cuando se basa en características sexuales de tipo secundario, para evitar errores al momento de asignar el sexo de un individuo.

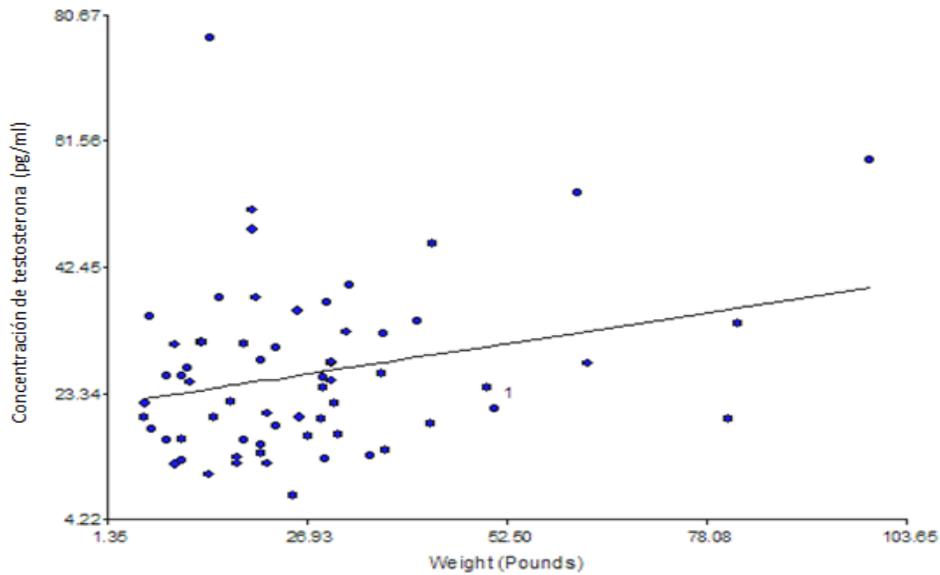


Figura 3. Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas hembra.

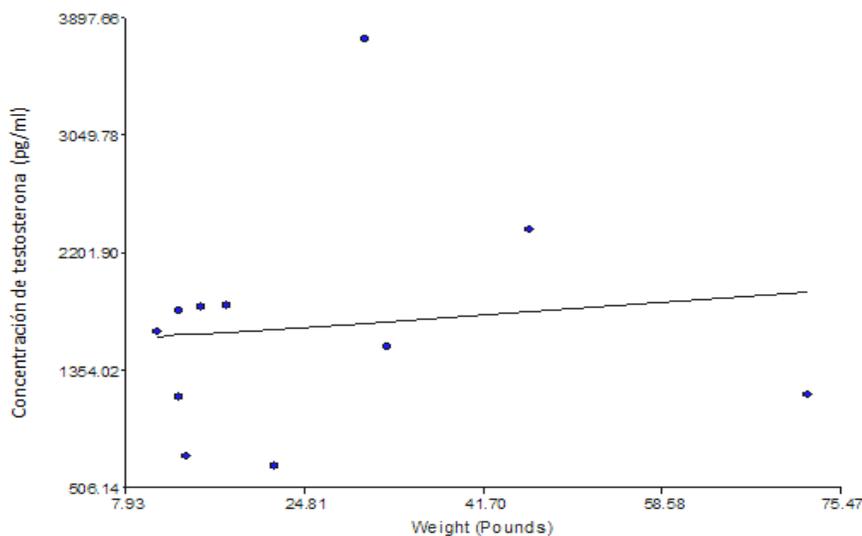


Figura 4. Relación entre la concentración de testosterona y peso de tortugas macho.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

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

Chaloupka k, Musick P, Snover P. 2012 Status of the hawksbill turtle (*Eretmochelysimbricata*) in the Caribbean region. Chelonian Conserv Biol 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

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.

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 (*Eretmochelys imbricata*) 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, M. J., M. J. Peterson, J. A. Seminoff, E. Altamirano, A. V. Henríquez, A. R. Gaos, V. Gadea, P. Torres, J. Urteaga, B. P. Wallace, and T. R. Peterson. 2015. One size does not fit all: importance of adjusting conservation practices for endangered hawksbill turtles to address local nesting habitat needs in the eastern Pacific Ocean. Biological Conservation 184:405–413.

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.

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.

7. Agradecimientos

A la iniciativa Carey del Pacífico Oriental (ICAPO), al laboratorio endocrinológico del South west Fisheries Science Center (SWFSC) de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), por todo su apoyo logístico y técnico para llevar a cabo esta investigación.