



<https://revistaagrocienza.wordpress.com/>

DOI:10.5281/zenodo.10912976

Artículo de investigación

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

Determination of the sex ratio of immature Hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) by detecting testosterone with the ELISA test

Chavarría-Pérez, I.M¹ Melara Soriano, M¹, Liles, M.J², Castro-Menjívar, J.A³

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 en 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 5.8:1 (hembras/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.

ABSTRACT

The determination of the sex ratio of sea turtles in forage habitats is of great interest for their conservation. These individuals lack secondary sexual characteristics, making sexing difficult; therefore, the use of techniques such as enzyme-linked

1 Departamento de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. marie_chavarría@yahoo.com, mauri-vet@hotmail.com

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

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

immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of testosterone is important for wildlife research. The study was carried out in Jiquilisco Bay, Usulután, El Salvador, between the months of August 2017 and February 2018. 77 blood samples were collected from juvenile Hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) from which blood plasma was collected. The samples were sent to the endocrinology laboratory of the Southwest Fisheries Science Center (SWFSC) of the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) in La Jolla, California, United States, to perform the ELISA test. The results demonstrate a 5.8:1 hawksbill sex ratio (female/male). The testosterone concentration values of immature females had a variation of 7.7-77.20 pg/ml. While the immature males presented a variation between 660.30-3083.20 pg/ml. Regarding the correlation between testosterone concentration and carapace length, a probability of $p=0.783$ was obtained in females and a probability of $p=0.0847$ in males, so there is no significant relationship; for the variables testosterone concentration and weight, a probability $p=0.741$ was obtained in females and a probability of $p=0.7382$ in males, so there is no significant relationship. Concluding that the use of morphometric parameters is not reliable for the sexing of immature individuals and the use of the testosterone ELISA technique is a safe and reliable option for sex determination in immature sea turtles.

Key words: *Eretmochelys imbricata*, sex ratio, testosterone, ELISA, feeding areas, Jiquilisco bay.

INTRODUCCIÓN

La determinación de la proporción sexual es un tema de gran interés en la biología y conservación de las tortugas marinas, ésta 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, origina 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 neonatas hembras; únicamente 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 acerca de 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 para el análisis de ELISA, laparoscopia y el Radioinmunoensayo, obteniendo una alternativa

para la determinación sexual de los individuos, que evita el uso de métodos invasivos y de mayor costo. La técnica de ELISA ha sido utilizada en especies marinas para el control de su salud, reproducción, respuesta al estrés y determinación sexual, es una técnica precisa y de menor costo (Allen *et al.* 2015).

En la República de El Salvador, el Convenio sobre la Diversidad Biológica y las leyes nacionales, brindan protección a la tortuga Carey por ser una especie en peligro crítico de extinción (Liles *et al.* 2014). Existen normativas que prohíben la recolección y venta de huevos de tortugas marinas para fines distintos de conservación y que mitigan su captura incidental en la pesca. Sin embargo, la aplicación de estas medidas es 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).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Bahía de Jiquilisco, ubicada en el 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 cero metros sobre el nivel del mar (msnm) y la altitud máxima registrada es de 40 msnm (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, va desde los 65.15% durante la época seca y de 78.15% en época lluviosa (MARN 2013a).

El estudio se realizó entre los meses de agosto 2017 y febrero 2018; las unidades experimentales a tomar en cuenta fueron 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, El Salvador.

Metodología de campo

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 por medio de la visualización de la tortuga. 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.

Extracción de muestra de Sangre

Las muestras de sangre fueron extraídas del seno cervical dorsal (Wyneken 2004). Para la recolección de las mismas, 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, El Salvador. Se realizó la centrifugación de las muestras a 5,000 rpm, durante diez 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.

Metodología de laboratorio.

Las muestras fueron enviadas al laboratorio endocrinológico del SWFSC de la NOAA, para su procesamiento y análisis, además se utilizó el kit comercial de ELISA (Catalogo # ADI-900- 065, Enzo Life Sciences®, Plymouth, PA) para detección de testosterona y determinar su concentración en las muestras de plasma obtenidas, todas estas muestras fueron cuantificadas con su respectivo duplicado.

Análisis estadístico

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron las muestras de 77 tortugas Carey inmaduras mediante la técnica de ELISA para testosterona (Cuadro 1), presentan 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, El Salvador.

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 utilizó lo formula:

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

donde: a= Número de hembras; b= Número de machos.

La proporción sexual de tortugas Carey inmaduras en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador, es de 5.8:1 (hembra/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 en este estudio de El Salvador, 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, El Salvador (Cuadro 1). Es importante determinar la variación de la proporción sexual entre diferentes especies y poblaciones, para determinar la existencia de diferencia significativa en cuanto a la variación entre proporciones, poblaciones, esto facilita la comprensión de la dinámica reproductiva de la especie (Chaloupka *et al.* 2012). 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 poco invasiva y

reduce los costos de investigación en comparación de otras técnicas que requieren mayor uso de recursos para su ejecución en campo.

En el caso de la tortuga Carey de la zona forrajera de la Bahía de Jiquilisco, El Salvador, 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 (Cuadro 2). Es importante establecer los valores de referencia de la concentración de testosterona plasmática para las diferentes especies, estos datos son un indicador de salud y en la determinación del sexo de los especímenes.

Según Allen *et al.* (2015), en las hembras de tortuga verde inmaduras, su 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 *et al.* (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 en El Salvador, así como el estudio de Allen *et al.* (2015) en tortugas verde.

Cuadro 2. Concentración de testosterona en tortugas Carey inmaduras, muestreados en la bahía de Jiquilisco, El Salvador.

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), es una medida poco confiable para ser considerada representativa al momento del sexado de un individuo inmaduro. Según Chacon-Chaverri (2004) y Eckert *et al.* (1999), para individuos adultos, el sexado 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

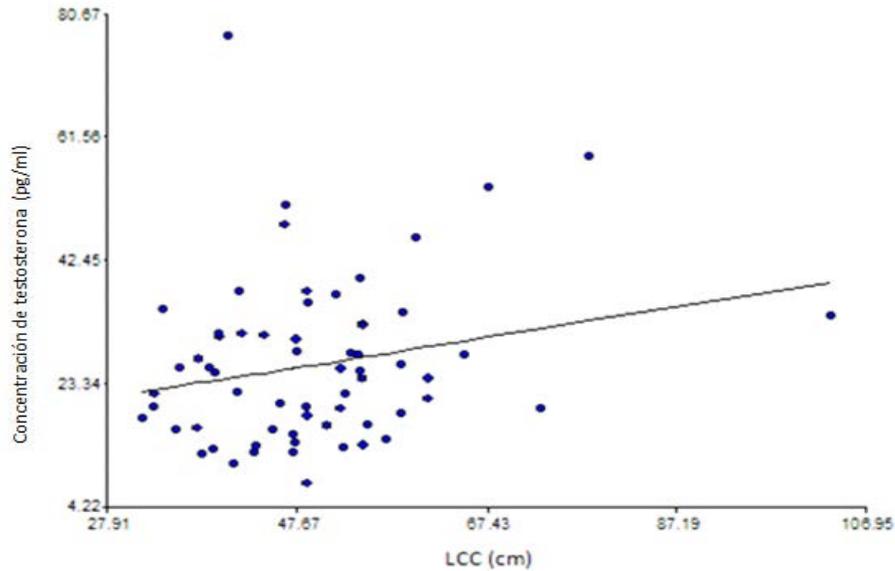


Figura 1. Relación entre concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas hembra de tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*).

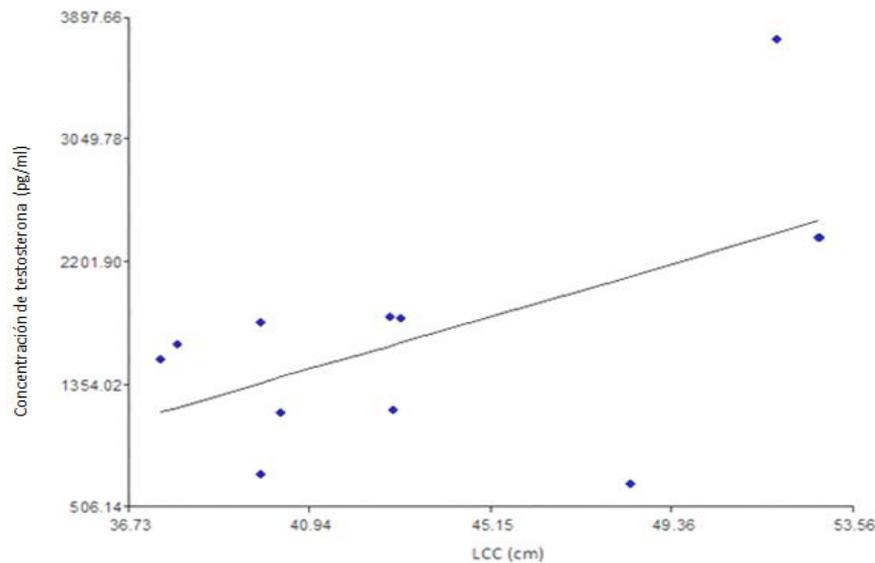


Figura 2. Relación entre concentración de testosterona y largo curvo de caparazón de tortugas macho de tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*).

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), es 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 y Díez (1999), aconsejan 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.

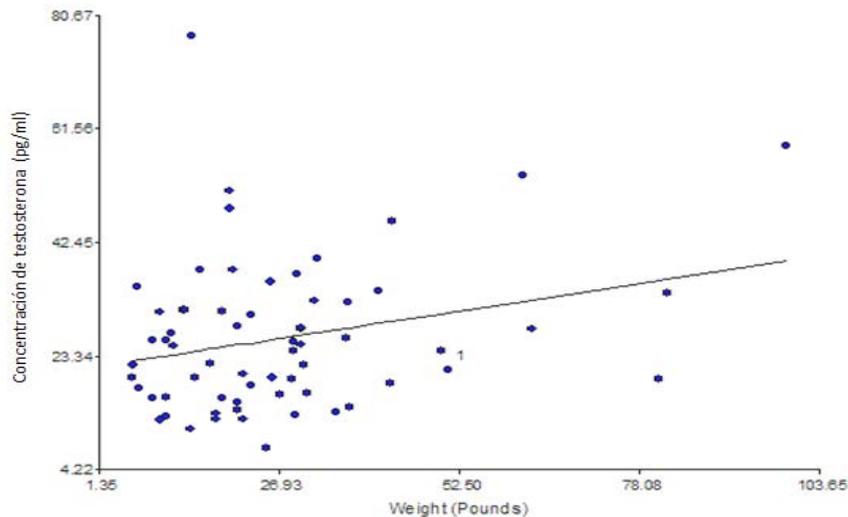


Figura 3. Relación entre concentración de testosterona y peso de tortugas hembra de tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*).

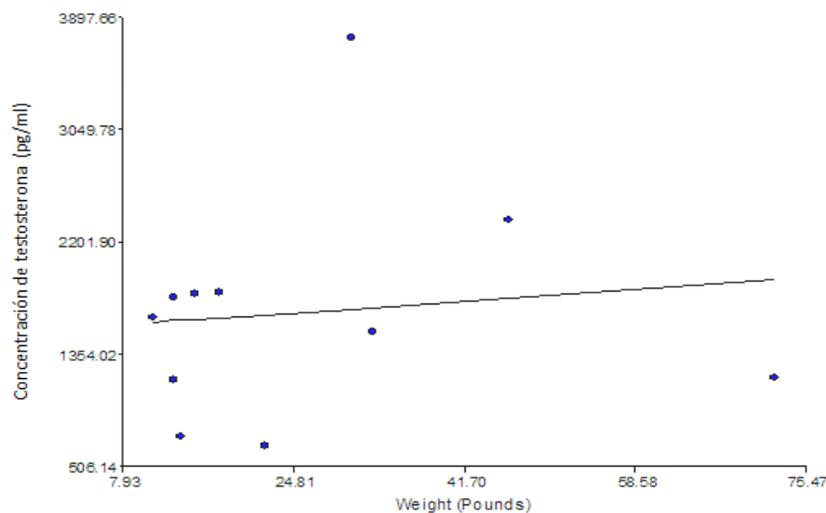


Figura 4. Relación entre concentración de testosterona y peso de tortugas macho de tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*).

CONCLUSIONES

La proporción sexual de las tortugas Carey inmaduras de la Bahía de Jiquilisco, El Salvador, se encuentra sesgada hacia las hembras con 5.8:1 (hembra/macho).

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, constituye información vital para inferir el estado de la población y sobrevivencia de cada sexo de la especie en las zonas de alimentación.

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 la medición de concentración de testosterona.

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 la investigación.

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. 9-14pp.
- 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.
- 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
- 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. *ChelonianConservBiol* 3: 177-184
- 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. Genetics and demography in biological conservation. *Science New York*. Volumen 241 (4872). 1455-1460pp
- Leon YM, Diez CE. 1999. 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, Linconln YS, Seminoff JA, Gaos AR, Peterson TR. 2014. 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- 1404pp.
- 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. Spatio-temporal variation in the incubation duration and sex ratio of hawksbill hatchlings: implication for future management. *Journal of thermalbiologyElsevier*. Volumen 44. 70-77pp
- 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; 103-134pp.

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