

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de sexo por medio de histología gonadal en neonatos de tortugas parlama (*Lepidochelys olivacea*) en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala.

Trabajo de graduación

presentado por

María Andrea Santa Cruz Huard

para optar al grado académico de Licenciada en Biología.

Guatemala
2022

Determinación de sexo por medio de histología gonadal en neonatos de tortugas parlama (*Lepidochelys olivacea*) en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de sexo por medio de histología gonadal en neonatos de tortugas parlama (*Lepidochelys olivacea*) en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala.

Trabajo de graduación

presentado por

María Andrea Santa Cruz Huard

para optar al grado académico de Licenciada en Biología.

Guatemala
2022

Vo. Bo.

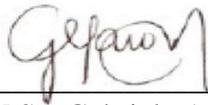


M.Sc. Daniel Ariano

Tribunal examinador:



M.Sc. Daniel Ariano



M.Sc. Gabriela Alfaro



M.Sc. Andrea María Cifuentes Girard

Fecha de aprobación: Guatemala, 20 de junio de 2022.

PREFACIO

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo de diversas personas. Agradezco a mi asesor Daniel Ariano y co asesora Andrea María Cifuentes Girard por el apoyo durante todo el trabajo, asesoría y revisión de este estudio. Agradezco el apoyo de Victor Gudiel Corona y Jennifer Carbonell por la ayuda en el muestreo de neonatos, por la recopilación y documentación de datos. Agradezco a Leyda y Ana Lucía Dubón por el apoyo y trabajo diario realizado en el laboratorio de Fitopatología en la Universidad del Valle de Guatemala. Agradezco al tortugario El Banco por permitir realizar investigación y muestreo en sus instalaciones. Por último agradezco a toda mi familia por brindarme la oportunidad y el apoyo durante toda mi carrera universitaria, porque sin ellos no lo hubiera logrado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE CUADROS	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
A. Cambio climático.....	2
B. Determinación del sexo dependiente de la temperatura y sus efectos	2
C. Tortugas marinas.....	3
D. Tortuga parlama (<i>Lepidochelys olivacea</i>) y sus amenazas.....	3
G. Conservación de tortugas en Guatemala.....	7
III. JUSTIFICACIÓN	8
IV. OBJETIVOS	9
A. Objetivo general:	9
B. Objetivos específicos:.....	9
V. METODOLOGÍA	10
A. Área de estudio	10
B. Toma de muestras.....	11
1. Muestreo.....	11
2. Procesamiento histológico.....	11
a. Obtención de tejido.....	11
b. Fijación.....	12
c. Infiltración.....	13
d. Cortes histológicos.....	14
e. Tinción.....	14
1) Observaciones microscópicas.....	15
2) Variables morfométricas.....	15
VI. RESULTADOS	16
VII. DISCUSIÓN	20
VIII. CONCLUSIONES	23
IX. RECOMENDACIONES	24
X. BIBLIOGRAFÍA	25
XI. ANEXOS	31

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de las tortugas marinas.....	6
Figura 2. Localización del Tortugario El Banco, Guatemala.....	11
Figura 3: Gónadas de <i>L. olivacea</i>	14
Figura 4: Testículo de <i>L. Olivácea</i> (A) y ovario (B) teñidos con H/E.....	18
Figura 5: Ovario de <i>L. olivacea</i> teñido con H/E.....	19

Lista de cuadros

Cuadro 1. Secuencia de tiempos y soluciones en que estarán los casetes en el procesador automático de tejidos.....	13
Cuadro 2. Caracteres morfométricos de neonatos de <i>L. olivacea</i> en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala tomados durante los meses de agosto y octubre 2021.....	18
Cuadro 3. Caracteres morfométricos de neonatos de <i>L. olivacea</i> en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala, tomados durante los meses de octubre y noviembre 2021.....	19
Cuadro 4. Promedio de la temperatura correspondientes al período de incubación de neonatos de <i>L. olivacea</i> evaluados en el tortugario El Banco, durante los meses de septiembre octubre y noviembre 2021.	20

RESUMEN

La tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), está clasificada actualmente dentro de la categoría —Vulnerable, según la lista roja de especies amenazadas de la IUCN (Abreu- Grobois & Plotkin, 2008). La caza, la captura incidental, la degradación de su hábitat y el comercio de sus huevos, son las principales razones por las que se han visto reducidas las poblaciones de parlama (Abreu-Grobois & Plotkin, 2008). En Guatemala, la parlama también se encuentra clasificada en el Listado de Especies Amenazadas (LEA) del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP, 2009). Actualmente, se sabe que la temperatura de incubación de los nidos de tortugas marinas está relacionada con el sexo, dimensiones de caparazón, rendimiento locomotor, fitness de los neonatos y se ve influenciada por las variables climáticas. Por tal motivo, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar el sexo de neonatos de tortuga parlama (*L. olivacea*) provenientes del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala a través de la observación histológica de las gónadas. Se determinó que el 56 de los neonatos evaluados durante el 2021 fueron hembras y 4 fueron machos según el análisis y verificación histológica basada en el método de Wyneken *et al.* (2007). Los resultados de este estudio sugieren que el calentamiento global y factores externos pueden provocar una peligrosa feminización de las poblaciones de tortugas, lo que coincide con los resultados del presente estudio evaluados en el tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala durante el 2021.

ABSTRACT

The olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) is currently classified as Vulnerable, according to the IUCN Red List of Threatened Species (Abreu-Grobois & Plotkin, 2008). Hunting, bycatch, habitat degradation and egg trade are the main reasons why parlama populations have been reduced (Abreu-Grobois & Plotkin, 2008). In Guatemala, the parlama is also classified in the List of Threatened Species (LEA) of the National Council of Protected Areas (CONAP, 2009). Currently, it is known that the incubation temperature of sea turtle nests is related to sex, shell dimensions, locomotor performance, hatchling fitness and is influenced by climatic variables. For this reason, the objective of this research was to determine the sex of hatchling parlama turtles (*L. olivacea*) from the El Banco turtle hatchery, Santa Rosa, Guatemala through histological observation of the gonads. It was determined that 56 of the hatchlings evaluated during 2021 were females and 4 were males according to the analysis and histological verification based on the methods described by Wyneken *et al.* (2007). The results of this study suggest that global warming and external factors may cause a dangerous feminization of TSD turtle populations, which coincides with the results of the present study evaluated at the El Banco turtle hatchery, Santa Rosa, Guatemala during 2021.

I. INTRODUCCIÓN

El sexo de las tortugas marinas jóvenes es difícil de determinar porque, como en muchos otros reptiles con determinación sexual ambiental, carecen de cromosomas sexuales heteromórficos (Wibbels *et al.*, 2000) y no poseen dimorfismo sexual externo hasta cerca de la pubertad. El sexo y la proporción de sexos de las nidadas e incluso de los lugares de anidación a menudo se estiman indirectamente a partir de las temperaturas de los nidos, las temperaturas de la playa (Godfrey y Mrosovsky, 1999; Godley *et al.*, 2001a), y/o la duración de la incubación de los nidos (Godley *et al.*, 2001b; Marcovaldi *et al.*, 1997) y las precipitaciones (Godfrey *et al.*, 1996), más que por el examen directo de las gónadas de las crías. Existen diferentes métodos para determinar el sexo de las tortugas marinas neonatas como por ejemplo los estudios laparoscópicos, los análisis hormonales en sangre, radioinmunoanálisis de los niveles de testosterona (Wibbels *et al.*, 2000) y la relación estrógeno-testosterona de estrógeno y testosterona; pero el examen histológico de la gónada se considera el método más fiable para determinar el sexo en tortugas marinas neonatas (Mrosovsky y Godfrey, 1995). Sin embargo, las herramientas histológicas no son accesibles para muchos investigadores, no son útiles en el campo, donde los nidos se inspeccionan a menudo después de la eclosión de las crías, e implican la destrucción de una gónada, lo que puede ser un problema para los especímenes que se encuentran en colecciones de museos. El incremento acelerado de la temperatura global debido al cambio climático podría afectar negativamente a las poblaciones de tortugas marinas al alterar la proporción de sexos y disminuir la producción reproductiva, asimismo, se ha encontrado que la temperatura de incubación altera e influye en factores como: éxito de eclosión, rasgos morfológicos y fisiológicos de las tortugas, tiempo de desarrollo, tamaño corporal, tasa de crecimiento y rendimiento locomotor. Por tal motivo, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar el sexo de neonatos de tortuga parlama (*L. olivacea*) provenientes del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala a través de la observación histológica de las gónadas para propósitos de conservación y manejo.

II. ANTECEDENTES

A. Cambio climático

Según el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) se ha establecido que dependiendo de los escenarios de emisiones de gases de efecto invernadero, la temperatura media global en superficie podría aumentar entre 0.3 a 4.8 °C a finales del siglo XXI (2081-2100) (IPCC, 2014). Entre los sectores que se verán seriamente afectados por el cambio climático, especialmente por el aumento de la temperatura media global, se encuentran la biodiversidad y la productividad de los ecosistemas (Hitz y Smith, 2004; Holmgren, Schefer, Ezcurra, Gutiérrez y Morhen, 2001; IPCC, 2007; IPCC, 2009).

Los efectos del cambio climático sobre la vida pueden observarse a distintos niveles, que incluyen respuestas de los organismos a nivel individual, en las interacciones con otras especies, en la amplitud de su distribución geográfica e, incluso, en la de los propios ecosistemas. Las especies más vulnerables al cambio climático son aquellas que dependen en gran medida de la temperatura ambiental para sus rasgos de vida y aquellas que exhiben determinación del sexo dependiente de la temperatura como algunos peces, reptiles y todas las especies de tortugas marinas (Fisher, Godfrey y Owens, 2014; Montero *et al.*, 2018).

B. Determinación del sexo dependiente de la temperatura y sus efectos

Las tortugas poseen variados sistemas de determinación sexual, incluyendo mecanismos bajo el control del genotipo del individuo (DSG) y mecanismos bajo el control de la temperatura ambiental (DST) (Bull 1983, Valenzuela y Lance 2004, Valenzuela 2008c). Los mecanismos dependientes de la temperatura son en general más comunes en tortugas que los mecanismos genotípicos, y las tortugas poseen dos de los tres tipos de DST conocidos en vertebrados, DST-Ia y II. El sistema DST- Ia es aquel donde los machos son producidos a temperaturas bajas y las hembras a temperaturas altas, por lo que también se denota como sistema DST MH (macho- hembra), mientras que el sistema II es aquel que produce machos a temperaturas intermedias y hembras a valores mayores y menores, por lo que se denota también como DST HMH (hembra-macho-hembra). Otro parámetro importante es el de la temperatura pivotal, que es aquella temperatura constante que produce ambos sexos en proporción 1:1 a nivel poblacional, y que puede diferir de la temperatura umbral de cada individuo (Valenzuela y Lance 2004). El sexo de los neonatos de las tortugas marinas se determina durante el período termosensible que corresponde al final del primer tercio y al comienzo del segundo tercio del desarrollo embrionario o período de incubación (Mrosovsky y Pieau, 1991).

Los escenarios de cambio climático predicen tanto el aumento de la temperatura global promedio como el incremento de la varianza térmica durante la temporada reproductiva de muchas especies de tortugas con DST (Neuwald y Valenzuela 2011), lo cual puede causar

una feminización drástica de las poblaciones y un aumento de la mortalidad embrionaria que conllevaría a la disminución del potencial reproductivo y eventual extinción. Los estudios han establecido que la aparición de anomalías en el caparazón está relacionada a condiciones de incubación como la temperatura y humedad, contaminación ambiental y bioacumulación de metales (Córtez, Romero y Girondot, 2018; Velo, Becker y Cordero, 2011).

C. Tortugas marinas

Las tortugas marinas se clasifican en dos familias taxonómicas, Cheloniidae con siete especies y Dermochelyiidae con una sola especie. Las siete especies de tortugas marinas son: tortuga parlama o golfina (*Lepidochelys olivacea*), tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), tortuga verde (*Chelonia mydas*), tortuga boba (*Caretta caretta*), tortuga de Kemp (*Lepidochelys kempi*), tortuga plana (*Natator depressus*) y tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) (Bowen y Karl, 2007).

Las tortugas marinas tienen un ciclo de vida muy complejo, utilizan varios hábitats en su desarrollo, realizan migraciones de miles de kilómetros entre las zonas de alimentación y las playas de desove (Figura 1), pueden vivir por muchos años y presentan una edad de madurez sexual tardía (Rueda, 2005).

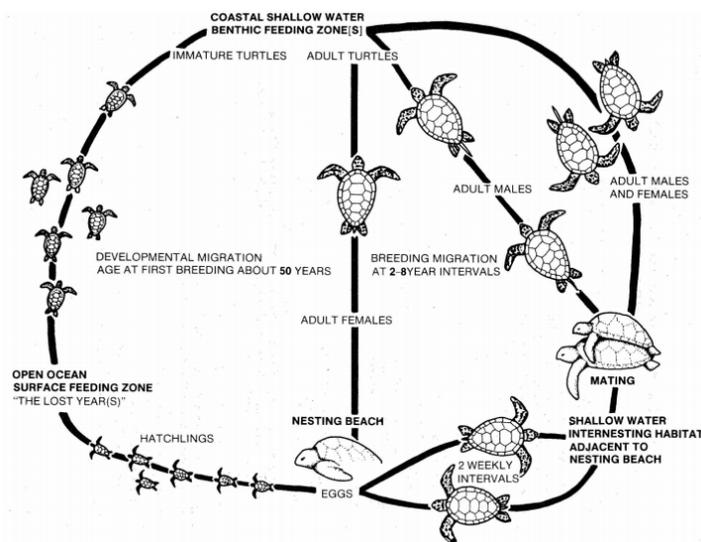


Figura 1. Ciclo de vida de las tortugas marinas. (Chaudhari, Prasad y Shanker, 2009).

D. Tortuga parlama (*Lepidochelys olivacea*) y sus amenazas

Especie más abundante en la actualidad, se observa desde el noroeste de la Península de Baja California y el Golfo de California, hasta Chile. Está clasificada como en peligro de extinción por la UICN. El colapso de las poblaciones de esta especie fue provocado por la sobreexplotación de los adultos que se capturaron por millones en las playas donde ocurrían fenómenos de arribadas (Rueda, 2007). Es una de las tortugas marinas más pequeñas, su

longitud promedio es de 65 cm y tiene un peso de 45 kg. Se distingue por la forma redondeada del caparazón y el elevado número de escudos en el caparazón que oscila entre 5 y 9 pares, los márgenes son lisos, el caparazón es de color verde oliva, con una superficie inferior de color amarillo (Eckert, 2001).

En cuanto a reproducción, la tortuga parlama se caracteriza por un comportamiento de anidación variado, con algunas hembras anidando solitariamente y otras anidando de forma masiva conocida como arribadas (Bézy, Valverde y Plante, 2015). La tortuga parlama tiene una reproducción anual, a diferencia de bianual como en otras especies. Las hembras anidan de dos a tres veces por temporada, con intervalos de 14 a 48 días. El tamaño de la puesta es de 80 a 100 huevos (Rueda, 2005). La temperatura pivotal de la tortuga parlama *L. olivacea* en Costa Rica se determinó que oscila entre 30 a 31°C (Wibbels, Rostal y Byles, 1998).

Existe alta presión antropogénica sobre los ecosistemas costeros y marinos, principalmente por la pesca industrial (Luna *et al.*, 2008). Las principales actividades que amenazan a las tortugas marinas en Guatemala son el saqueo de huevos en las playas de anidación, captura y muerte incidental de adultos por operaciones pesqueras industriales (pesca de arrastre, con línea, con red agallera), desarrollo de la costa con fines urbanos, turísticos o industriales, así también restaurantes y los asentamientos humanos en las proximidades de las playas de anidación, y la circulación de vehículos en las playas. Las primeras dos mencionadas son las amenazas más serias para las tortugas marinas en Guatemala (CONAP, 2010).

De las especies de tortugas marinas existentes, la tortuga parlama es una de las especies que han mostrado una recuperación poblacional más sólida en los últimos años (Eguchi *et al.*, 2007; Peavey *et al.*, 2017) después de haber tenido números extremadamente bajos en el siglo pasado (Fonseca *et al.*, 2009). La incubación in situ de las tortugas parlama ha sido casi inexistente en Guatemala durante las últimas décadas, lo que sugiere que las tendencias positivas de anidación son probablemente el resultado de casi 30 años de esfuerzos de conservación intensivos, participativos y basados en criaderos (Ariano-Sánchez, Muccio, Rosell *et al.*, 2005). La conservación a largo plazo incluye la protección de las playas y la reubicación de los nidos en los criaderos, también han contribuido a revertir la disminución de la anidación de las poblaciones de tortugas marinas en peligro de extinción, como las tortugas verdes en Tortuguero, Costa Rica (Troeng y Rankin, 2005) y las tortugas parlama en Playa Cuixmala, México (García *et al.*, 2003).

E. Metilación dimórfica del ADN y período termosensible

Informes recientes correlacionan los procesos epigenéticos con la diferenciación sexual: La metilación del ADN es necesaria para la diferenciación de las células de Sertoli y la formación de cordones testiculares en las gónadas murinas (Mizukami *et al.*, 2008). En la tortuga olivácea *L. olivacea*, la diferenciación de la gónada bipotencial en un testículo u

ovario tarda varios días, lo que permite estudiar los cambios estructurales y moleculares durante la determinación del sexo y la diferenciación (Merchant-Larios y Díaz-Hernández, 2013). Según estudios realizados por Venegas *et al.*, se encontró un patrón de metilación del ADN entre los ovarios y los testículos que dependía de la temperatura de incubación. El perfil de metilación del ADN en la gónada bipotencial se modifica por metilación o desmetilación, de modo que el perfil difiere entre los ovarios y testículos diferenciados. Los cambios en la metilación del ADN pueden ser necesarios para la estabilización de las redes de expresión génica que impulsan la diferenciación de la gónada bipotencial para formar un ovario o un testículo.

Es importante destacar que los eventos de metilación del ADN, así como la desmetilación, se llevan a cabo durante el período termosensible, estableciendo patrones de metilación del ADN en las gónadas diferenciadas. El período embrionario termosensible para la determinación del sexo es un concepto útil en especies con determinación del sexo dependiente de la temperatura. Permite delimitar el rango de desarrollo cuando la temperatura influye en el fenotipo sexual. La temperatura influye en la determinación del sexo durante un periodo específico del desarrollo embrionario, que comienza cuando la gónada comienza a formarse. A temperaturas de incubación constantes, este periodo termosensible para la determinación del sexo (TSP) se sitúa en el tercio medio de la duración de la incubación (MTID). Cuando la temperatura fluctúa, la posición del periodo termosensible para la determinación del sexo puede desplazarse del MTID porque el crecimiento del embrión se ve afectado por la temperatura. Los resultados de los nidos naturales y las simulaciones muestran que la aproximación del periodo termosensible para la determinación del sexo al tercio medio de la duración de la incubación puede crear un sesgo casi sistemático hacia temperaturas más bajas al calcular la temperatura media de incubación durante este periodo y, por tanto, un sesgo hacia los machos en la estimación de la proporción de sexos. Esta diferencia puede tener importantes implicaciones para la conservación de las tortugas marinas. Por otro lado, la proporción de sexos en las playas de anidación está a veces muy sesgada hacia la producción de hembras (Girondot, M., Monsinjon, J., y Guillon, J., 2018).

F. Ontología gonadal de *Lepidochelys olivacea*

Al emerger las crías, las gónadas aparecen como una estructura blanquecina alargada sobre la superficie ventral del riñón, la cual no puede ser distinguida a simple vista como un ovario o un testículo (Miller y Limpus, 2003). Histológicamente, en los machos de crías de *L. olivacea*, el testículo presenta un epitelio superficial plano, monoestratificado que frecuentemente contiene varias células germinales. Bordeando el epitelio superficial está una membrana basal y abundante tejido estromático, formado en gran parte por matriz extracelular, células fibroblásticas y vasos sanguíneos (Fig. 2A).

Por otro lado, los ovarios de crías de *L. olivacea* se distinguen por un engrosamiento conspicuo del epitelio superficial. Este aparece como un epitelio columnar, con una o más

células de espesor. Contiene una membrana basal gruesa que separa el epitelio superficial de la región medular de la gónada. Los cordones medulares son vestigiales y aparecen como pequeños grupos de células epiteliales rodeadas de una membrana basal (Fig. 2B) (Merchant-Larios, 2000).

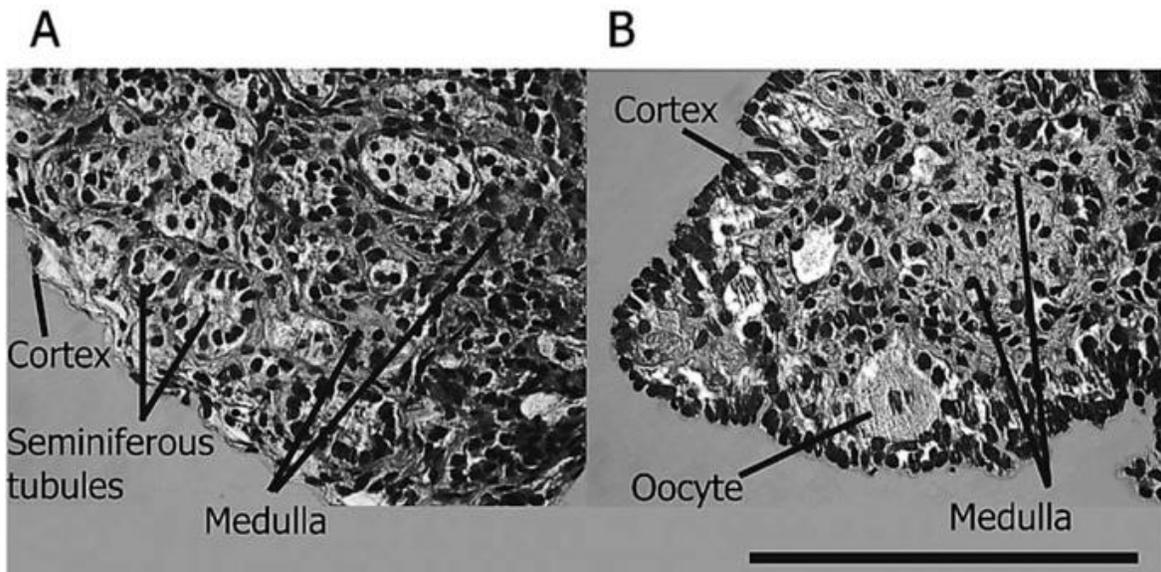


Figura 2. Testículo de *L. olivacea* (A) y ovario (B) teñidos con H/E. El testículo se caracteriza por una corteza poco desarrollada y una médula bien organizada formada por túbulos seminíferos. Los ovarios tienen una corteza de células basófilas y la médula está mal organizada.

(Wyneken, J *et al.*, 2007).

Se presentan muchas dificultades asociadas a la estimación de la proporción de sexos en las poblaciones de tortugas. En contraste a los adultos, identificar el sexo en tortugas juveniles y crías representa un significativo obstáculo logístico. Se ha propuesto y desarrollado una variedad de métodos no letales para determinar el sexo en las tortugas juveniles. Varias técnicas han sido demostradas como aptas para una identificación fisiológica o molecular del sexo. Estas incluyen cariología, prueba de antígenos HY en las células sanguíneas, prueba de hibridación con ADN y análisis de los niveles de testosterona en sangre (Merchant-Larios, 2000).

Métodos no invasivos: se han examinado los niveles de estrógeno y testosterona en la sangre o el fluido corioalantónico y amniótico por medio de radioinmunoanálisis. Sin embargo, Merchant-Larios (2000) en *L. olivacea*, no encontró diferencias en los niveles de estas hormonas entre los sexos, por lo que esta técnica requiere de mayor validación. Métodos invasivos: están disponibles tres procedimientos basados en observaciones morfológicas (Wibbels, 2003).

G. Conservación de tortugas en Guatemala

En 1971, el Instituto Nacional Forestal –INAFOR- (que actualmente es el Instituto Nacional de Bosques- INAB-), estableció el primer tortugario en la aldea Hawaii, comunidad pesquera ubicada a 8 kilómetros al este de Monterrico, el cual sentó un precedente para el establecimiento de nuevos tortugarios a lo largo del litoral de la costa del Pacífico. La historia de la conservación de tortugas marinas en Guatemala se basa en un alto porcentaje en el uso de tortugarios (viveros o corrales) en donde, donaciones o cuotas de conservación voluntarias de huevos, son incubados y luego los neonatos son liberados en las playas con rumbo al mar (ARCAS, 2015).

La Asociación de Rescate y Conservación de la Vida Silvestre (ARCAS) administra el HPA desde su base en el Parque Hawaii, que también alberga el tortugario Hawaii, el más antiguo, e históricamente uno de los criaderos de tortugas marinas más productivos de la costa del Pacífico de Guatemala. Desde 1993, ARCAS ha operado tortugarios en Hawaii y en el pueblo de El Rosario, a 6 km al este, recogiendo e incubando entre 40.000 y 60.000 huevos de tortuga al año (Juárez y Muccio, 1997; Brittain *et al.*, 2007). Junto con estos esfuerzos, ARCAS ha llevado a cabo estudios estandarizados de nesting track surveys a lo largo de un transecto de 7,5 km para monitorear la abundancia de hembras de tortuga parlama que anidan anualmente desde 2003.

El documento base que rige las actividades de conservación de tortuga marina en Guatemala es la Estrategia Nacional de Manejo y Conservación de Tortugas Marinas (ENTM) elaborado en el año 2002 por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas - CONAP- durante el 2018 se planteó una estrategia de conservación mediante la resolución 03-17-2017: normativo para el manejo y conservación de tortugas marinas. El mismo normativo tiene como objetivo regular el uso, manejo y conservación de tortugas marinas y promover los mecanismos necesarios de carácter institucional para promover playas naturales de anidación de tortugas marinas (CONAP, 2018). Los tortugarios guatemaltecos son fundamentalmente comunitarios, pues la mayoría de los huevos incubados son producto de donaciones o cuotas de conservación voluntarias por parte de residentes locales (ARCAS, 2015).

III. JUSTIFICACIÓN

El sexo de las tortugas marinas jóvenes es difícil de determinar porque, como en muchos otros reptiles con determinación del sexo dependientes del ambiente, carecen de cromosomas sexuales heteromórficos (Bull, 1980; Wibbels *et al.*, 2000) y no son externamente dimórfica hasta cerca de la pubertad. El sexo está determinado por el ambiente de incubación (principalmente temperatura) durante el tercio medio de la incubación (Miller, 1997; Valenzuela, 2004; Wibbels, 2003; Yntema y Mrosovsky, 1980). El incremento de temperaturas debido al cambio climático podría afectar negativamente a los nidos de tortugas marinas al alterar la proporción de sexos y disminuir la producción reproductiva (Hill *et al.*, 2015).

El sexo y la proporción de sexos de las nidadas e incluso de los lugares de anidación a menudo se estiman indirectamente a partir de las temperaturas de los nidos, las temperaturas de la playa (Godfrey y Mrosovsky, 1999; Godley *et al.*, 2001a), y/o la duración de la incubación de los nidos (Godley *et al.*, 2001b; Marcovaldi *et al.*, 1997) y las precipitaciones (Godfrey *et al.*, 1996), más que por el examen directo de las gónadas de las crías. En todas las especies de tortugas marinas no hay una característica morfología externa que pueda ser usada para determinar el sexo de organismos en estado de cría, y solo es posible a través de una disección y la observación directa de las gónadas (IUCN, 2012). Esto se realiza por medio de un método histológico, el cual permite determinar el sexo en tortugas marinas neonatas muertas.

Realizar este estudio en el tortugario El Banco, genera datos muy importantes para el cumplimiento de objetivos a nivel local y poder proveer información básica para ofrecer procedimientos para la toma de datos científicos y mecanismos para involucrar a comunidades locales en el manejo del recurso de la tortuga marina, impulsar procesos de conservación involucrando a la sociedad civil en base a la información científica disponible y apoyar actividades comunitarias relacionadas a tortugarios, especialmente de educación ambiental, ecoturismo y proyectos comunitarios. No solo se generan datos sino también se pueden implementar prácticas de manejo adaptativo que puedan minimizar los efectos de la temperatura en nidos artificiales y la optimización del manejo de tortugarios de toda el área.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general:

- Determinar el sexo de individuos de tortuga parlama (*L. olivacea*) provenientes del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala en estado de cría a través de la observación histológica de las gónadas.

B. Objetivos específicos:

- Implementar la técnica histológica desarrollada por Wyneken, J *et al.* (2007), para la determinación del sexo de tortugas parlama provenientes del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala.
- Determinar la proporción de sexos en neonatos de *L. olivacea* mediante el análisis histológico de las gónadas de tortugas marinas provenientes del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala.

V. METODOLOGÍA

A. Área de estudio

Ubicada en la comunidad de El Banco, en la costa del Pacífico de Guatemala, la estación “El Banco” es una estación biológica comunitaria. Establecido por la Asociación Fundaselva de Guatemala e Índigo Expeditions en 2017 con la misión de monitorear las poblaciones de tortugas marinas en peligro de extinción. El tortugario El Banco, se encuentra ubicado en la Comunidad El Banco, de Taxisco, Santa Rosa. Dicho tortugario se mantiene gracias a donaciones de los vecinos de la región. El recinto utilizado posee un tamaño de 73.81 metros cuadrados, se encuentra ubicado a 33m de la línea de marea baja. El tortugario no posee, hasta el momento, ningún instrumento de planificación, manual o guía de manejo de tortugas marinas.



Figura 3. Tortugario El Banco, Guatemala.

Foto por: Daniel Ariano

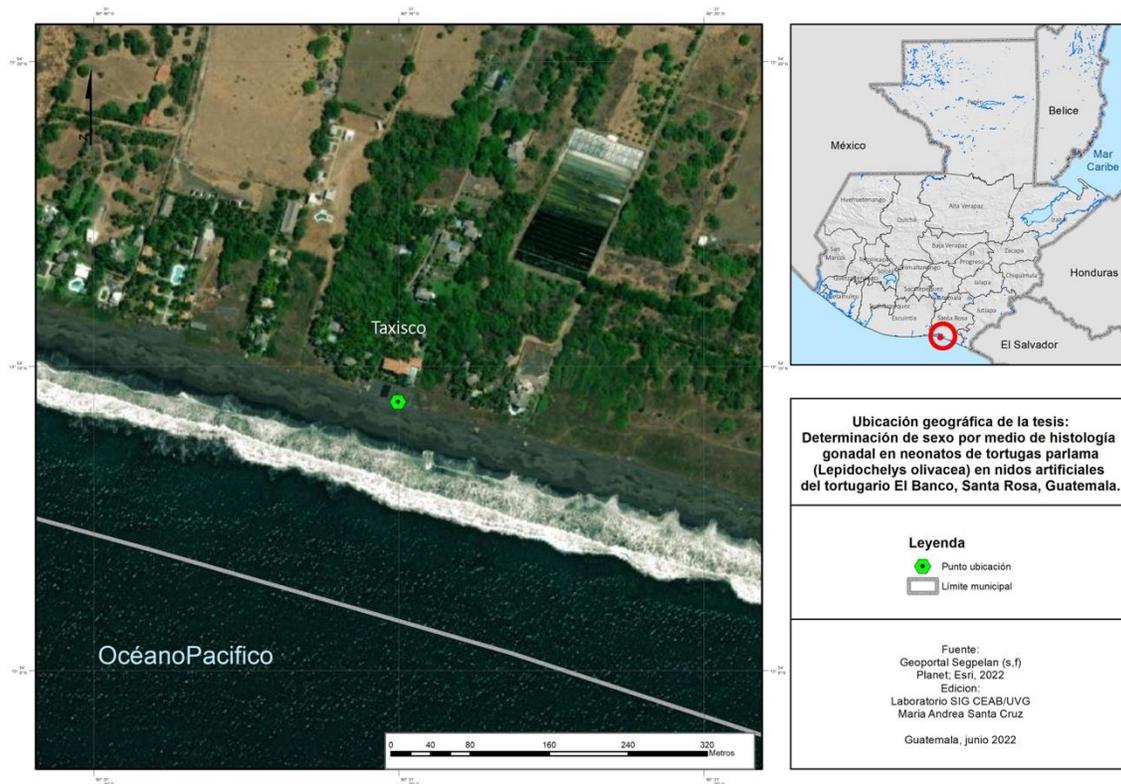


Figura 4. Ubicación geográfica del Tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala.

B. Toma de muestras

1. Muestreo

Se colectaron 60 neonatos del 25 de agosto al 2 de noviembre de 2021 de *L. olivacea*, que murieron después de emerger, etapa en la cual ya tienen un nivel de desarrollo gonadal para identificar el sexo. Esto se debe a que el sexo se determina en la segunda tercera parte del desarrollo embrionario, y no existen diferencias morfológicas externas evidentes entre sexos en neonatos (Marchant, 1999). Los especímenes fueron conservados en etanol al 70% para su traslado al laboratorio, donde se realizó la determinación del sexo.

2. Procesamiento histológico

a. Obtención del tejido

Se siguió la metodología de Wyneken, J *et al.* (2007). Se realizaron modificaciones según el equipo y materiales que se tenían disponibles. La disección para *L. olivacea* se realizó con bisturís calibre 21. Además, se utilizaron pinzas de disección para sostener y cortar partes del tejido que no fueran necesarias. En el laboratorio se tomaron muestras de las gónadas completas, la gónada era fácilmente identificable a simple vista y esta variaba de

tamaño conforme a los individuos. No se realizaron inoculaciones ni lavados. Las gónadas emparejadas se encuentran dentro de la cavidad celómica, caudales a los pulmones y normalmente están adheridas al peritoneo que recubre a los riñones. La técnica que se propone no es adecuada si los cadáveres están muy dañados, como aquellos en los que el cuerpo está lo suficientemente descompuesto o en los que las vísceras están lo suficientemente dañadas como para que el cuerpo colapse.



Figura 5. Localización de gónadas de *L. olivacea*

b. Fijación

Se utilizó un solo fijador para los tejidos a analizar, la solución fijadora FAA (formaldehído, etanol, acético). El formol y sus derivados son de los más utilizados en procesos de conservación de tejidos, en especial cuando luego se quiere hacer estudios histológicos con los mismos. Por otro lado, el etanol se utiliza para conservar glucógeno pero puede causar retracción en los tejidos. Junto con estos dos componentes se utiliza también el ácido acético, que es ideal para la fijación de nucleoproteínas y ácidos nucleicos. Este fijador es compatible con todas las tinciones histoquímicas (Gorodner, 2013; Megías, Molist y Pombal, 2019).

Los fragmentos de los tejidos preparados fueron fijados con el fijador mencionado anteriormente. Se realizó una extracción completa de las gónada, que fueron sumergidas en

la solución fijadora, contenida en frascos de vidrio; los cuales fueron colocados al vacío durante 2 horas y posteriormente almacenados en refrigeración a 4 grados centígrados, por un periodo de 24 horas para su posterior deshidratación. Al finalizar dicho periodo fue realizado un recambio de solución fijadora.

c. Infiltración

Para la deshidratación e infiltración se trasladó el tejido del frasco a un casete para tejido (64 ranuras por cara, 16x4), el cual estaba en un recipiente con etanol al 70% para cubrir la muestra. Luego se cerraron los casetes y se trasladaron a una canasta metálica dentro de un beaker (1L) con 700 ml de etanol al 70%. Después se trasladó el beaker a un procesador automático de tejidos (Autotechnicon serie 1158) para iniciar el ciclo. Cada ciclo de deshidratación consiste en la deshidratación del tejido en alcoholes, normalmente etanol, de gradación creciente hasta alcohol de 100°. Como se puede observar en el Cuadro 1, se utilizó etanol al 70%, 80%, 85%, 95% y 100%, además se utilizó tolueno y parafina caliente al finalizar el ciclo. La deshidratación debe ser completa porque de no ser así afectará a la infiltración posterior de la parafina. Se colocaron un total de 7 casetes por ciclo de deshidratación, por lo que se realizaron nueve ciclos para poder deshidratar las 60 muestras.

Cuadro 1. Secuencia de tiempos y soluciones en que estarán los casetes en el procesador automático de tejidos.

Solución/Medio	Tiempo en el que estuvo en el casette
Etanol al 70%	1 hora
Etanol al 70%	1 hora
Etanol al 80%	1 hora
Etanol al 80%	1 hora
Etanol al 85%	1 hora
Etanol al 85%	1 hora
Etanol al 95%	1 hora
Etanol al 95%	1 hora
Etanol al 100%	1 hora
Tolueno	1 hora
Parafina	2 horas

La función de este proceso es debido a que la parafina es hidrofóbica por lo que el agua del tejido debe ser removida previamente a ser infiltrada con un cambio de concentración de etanoles, ya que no se puede colocar directamente al 100% porque causaría que el tejido se deshidrate muy rápido, deformando el tejido. Se utilizó tolueno como sustancia aclarante ya que es rápido, permite conservar mejor la muestra y es de penetración más lenta que otros agentes como el xilol (Verdín, *et al*, 2013).

La metodología de infiltración consistió en transferir los casetes de tejido a depósitos de parafina fundida. El tejido infiltrado se retiró del casete y se metió dentro de un molde plástico del mismo tamaño. El molde se llenó con parafina fundida, la parte principal del casete etiquetado se colocó encima y este también se llenó con parafina. Algunos procedimientos requieren de la parafina a cierta temperatura, en este caso se utilizó a 60 ° C para que pudiera infiltrarse en el tejido y luego se dejó enfriar a 20 ° C, donde se solidificó hasta que tuviera una consistencia que permitiera que las secciones se pudieran cortar de manera uniforme.

d. Cortes histológicos

Se utilizó un micrótomo para parafina con mecanismo de rotación (American Optical 820). Se realizó un corte inicial con 10 µm para poder remover las primeras capas donde solo hay parafina, luego con 5 µm para realizar cortes más finos de los tejidos y poder ser colocados en el portaobjetos. Los mejores cortes fueron trasladados a un baño María (BioGen Tissue Float Bath, 2.3L) a 35°C en una solución de agua y gelatina sin sabor para que la parafina se estirara y pudiera adherirse al portaobjetos. Se utilizaron dos portaobjetos por muestra, en cada portaobjeto se colocaron de 2 a 3 cortes. Luego estos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se terminaron de secar en un horno (Boekel Scientific Slide Moat, 240000, (115V/230V)) a 60°C durante media hora.

e. Tinción

Se utilizó una sola tinción: Hematoxilina-eosina. La tinción histoquímica hematoxilina-eosina es la más empleada en histología, tiene como fundamento la afinidad ácido-base. La hematoxilina es un colorante básico que colorea las estructuras ácidas de un color púrpura; la eosina tiñe las estructuras básicas de una tonalidad rosada ya que es un colorante ácido. Sirve para estudiar la estructura general de los tejidos, se puede observar el núcleo, los ribosomas y el retículo endoplasmático teñido de azul púrpura y las proteínas del citoplasma con una tonalidad rosada (García, 2006).

1) Observación microscópica

La determinación de sexo de los neonatos de *L. olivacea* se realizó mediante el análisis de los cortes histológicos siguiendo la verificación histológica de Wyneken, J *et al.* (2007). Se revisaron en un microscopio óptico vertical Olympus CX23 con aumento 10x y 40x las laminillas obtenidas y se fotografiaron las características de hembras y machos de acuerdo con el criterio de Wyneken, J *et al.* (2007).

2) Variables morfométricas

Las variables morfométricas siguientes fueron proporcionadas por Jennifer Carbonell y Victor Gudiel: longitud del caparazón curvado (CLC), ancho de caparazón recto (CWS), ancho de caparazón curvado (CWC), longitud de la cabeza (HELEN), longitud de la aleta delantera izquierda recta (FLFL), longitud del plastrón recto (PLS), peso húmedo (WEIGHT), punto B a C en el caparazón (BC) y punto D a F en el plastrón (PDF) (Figura 6) (Michel-Morfín *et al.*, 2001). Todas las medidas morfométricas se tomaron en centímetros y milímetros y el peso en gramos.

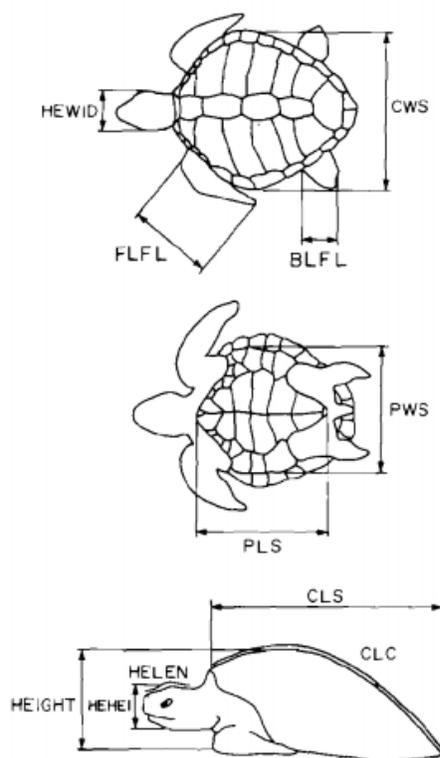


Figura 6. Variables morfométricas registradas en neonatos de *L. olivacea* (Michel-Morfín *et al.*, 2001).

VI. RESULTADOS

A. Ontología gonadal de *Lepidochelys olivacea*

Según el análisis y verificación histológica de Wyneken, J *et al.* (2007) se determinó que 56 de los 60 neonatos evaluados del tortugario El Banco durante el 2021 fueron hembras y 4 fueron machos (ver anexos fig. 9-68). Los machos se caracterizan en los cortes histológicos si la corteza estaba poco desarrollada (normalmente una capa celular de grosor) sobre una fina membrana fibrosa y cuando la médula estaba formada por túbulos seminíferos (Fig. 7). Por otro lado, las hembras se identificaron por tener una médula desorganizada y la presencia de una corteza bien desarrollada formada por dos a cinco capas de células basófilas (Fig. 7). En la mayoría de los casos era complicado observar ovocitos en desarrollo que presentaran múltiples nucleolos más oscuros (Wyneken *et al.*, 2007). El en caso de los cadáveres que estaban lo suficientemente descompuestos, los cortes histológicos no salieron totalmente completos y podía observarse solamente porciones de la corteza desarrollada y partes de la médula.

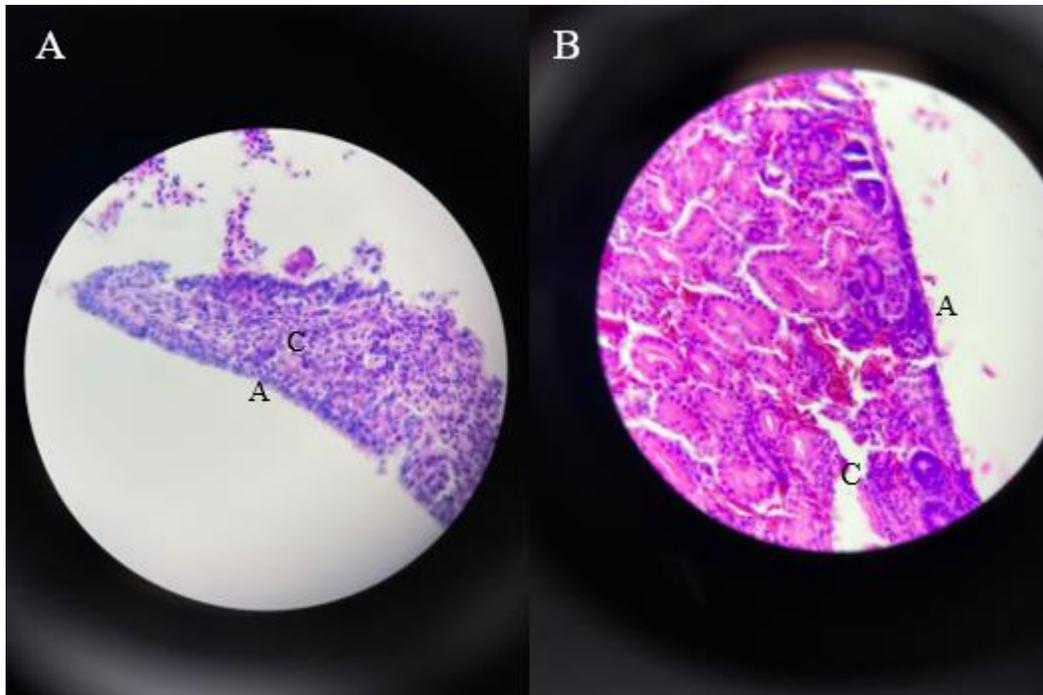


Figura 7. A) Ovario de *L. olivacea* teñido con Hematoxilina-Eosina. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (A) y una médula desorganizada (c). B) Testículo de *L. olivacea* teñido con Hematoxilina-Eosina. Se puede observar la corteza poco desarrollada (A) y una médula organizada (c).

B. MORFOMETRÍAS DE NEONATOS DE *L. OLIVACEA*

Cuadro 2. Caracteres morfométricos de neonatos de *L. olivacea* en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala, tomados durante los meses de agosto y octubre 2021 con los valores siguientes: longitud del caparazón curvado (CLC), ancho de caparazón recto (CWS), ancho de caparazón curvado (CWC), longitud de la cabeza (HELEN), longitud de la aleta delantera izquierda recta (FLFL), longitud del plastrón recto (PLS), peso húmedo (WEIGHT), punto B a C en el caparazón (BC) y punto D a F en el plastrón (PDF). Datos proporcionados por Victor Gudiel.

No.	Fecha	CLC (cm)	CWS (cm)	CWC (cm)	HELEN (cm)	FLFL (cm)	PLS (cm)	BC (cm)	PDF (cm)	PESO (g)
1	25/08/2021	4.3	3.3	3.5	1.7	4	3.35	3.1	1.45	18
2	25/08/2021	4.33	3.18	4.38	1.73	3.65	3.2	2.65	1.42	16
3	25/08/2021	4.46	3.49	4.52	1.57	3.68	3.19	2.95	1.59	20
4	25/08/2021	3.98	3.17	3.99	1.75	3.52	3.06	2.46	1.34	11
5	25/08/2021	4.4	3.35	4.59	1.83	3.69	3.35	3.01	1.47	16
6	25/08/2021	4.38	3.32	4.18	1.79	3.69	3.3	2.9	1.4	13
7	25/08/2021	4.32	3.37	4.34	1.78	3.6	3.39	2.93	1.36	14
8	25/08/2021	4.29	3.34	4.37	1.81	3.56	3.42	2.98	1.39	13
9	25/08/2021	4.02	3.25	4.44	1.92	3.59	3.26	2.53	1.41	15
10	10/10/2021	4.28	3.17	4.36	1.6	3.53	2.97	2.76	1.25	17
11	10/10/2021	4.98	2.98	4.31	1.69	3.41	2.79	2.34	1.36	15
12	10/10/2021	4.3	2.86	4.13	1.75	3.56	3.12	2.64	1.44	16
13	10/10/2021	4.41	3.31	4.25	1.49	3.46	3.03	2.78	1.48	17
14	10/10/2021	4.17	3.16	4.23	1.74	3.69	2.83	2.56	1.39	17
15	10/10/2021	4.47	2.86	3.98	1.68	3.44	3.01	2.61	1.31	15
16	10/10/2021	4.29	2.8	4.13	1.56	3.31	3.17	2.61	1.37	15
17	10/10/2021	4.35	2.73	4.2	1.68	3.43	3.2	2.77	1.41	16
18	10/10/2021	4.52	3	4.26	1.67	3.37	3.14	2.81	1.64	17
19	10/10/2021	4.72	3.37	4.21	1.75	3.23	3.12	3.02	1.54	15
20	10/10/2021	4.54	3.24	4.28	1.89	3.63	2.98	2.53	1.49	15

En el Cuadro 2 se puede observar que los caracteres morfométricos de los neonatos de *L. olivacea* en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala, tomados durante los meses de agosto y octubre de 2021 tienen un rango similar para cada uno de los caracteres, lo que no puede tomarse como indicador específico de la existencia de cualquiera de los dos sexos en esta nidada en específico.

Cuadro 3. Caracteres morfométricos de neonatos de *L. olivacea* en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala, tomados durante los meses de octubre y noviembre 2021 con los valores siguientes: ancho de caparazón recto (CWS), longitud de la cabeza (HELEN), longitud de la aleta delantera izquierda recta (FLFL), longitud del plastrón recto (PLS), peso húmedo (WEIGHT), punto B a C en el caparazón (BC) y punto D a F en el plastrón (PDF). Datos proporcionados por Jennifer Carbonell

No.	Fecha	Nido	CWS (mm)	PLS (mm)	WS (mm)	HELEN (mm)	FLFL (mm)	FRFL (mm)	BC (mm)	BD (mm)	CE (mm)	PDF (mm)	WEIGHT(g)
1	2/11/2021	1809	44	413	339	20	42	41	30	29	14	15	18
2	2/11/2021	1809	44	404	302	20	42	38	30	29	15	13	17
3	2/11/2021	1809	44	379	321	19	42	40	30	30	14	13	18
4	2/11/2021	1809	45	435	326	21	39	43	30	29	16	17	18
5	1/11/2021	1810	50	387	260	17	32	33	NA	NA	NA	NA	18
6	1/11/2021	1810	46	390	274	21	39	37	26	24	16	16	20
7	2/11/2021	1811	46	443	350	20	43	39	28	27	14	14	20
8	2/11/2021	1811	46	418	334	19	42	41	30	29	14	13	19
9	1/11/2021	1813	42	425	317	20	39	36	20	20	14	15	17
10	1/11/2021	1813	45	427	310	20	35	39	24	23	14	14	18
11	1/11/2021	1813	43	416	270	18	47	45	25	24	14	12	16
12	1/11/2021	1813	47	320	232	22	42	39	NA	NA	NA	NA	18
13	30/10/2021	1814	50	409	306	21	40	40	33	35	15	15	25
14	30/10/2021	1814	48	306	394	21	40	37	30	27	15	14	23
15	30/10/2021	1814	48	412	310	20	40	39	30	28	14	16	20
16	30/10/2021	1814	47	412	312	22	38	36	25	22	13	14	22
17	30/10/2021	1814	45	389	302	22	39	35	30	25	14	8	21
18	2/11/2021	1814	45	405	287	19	42	40	28	25	13	14	19
19	2/11/2021	1814	44	409	295	19	41	39	25	26	14	13	17
20	2/11/2021	1814	46	424	318	21	41	41	29	29	14	14	19
21	30/10/2021	1815	45	437	318	21	36	35	30	29	16	17	20
22	30/10/2021	1815	44	460	333	20	36	40	28	29	15	16	22
23	30/10/2021	1815	43	416	326	21	40	34	28	29	15	16	19
24	30/10/2021	1815	48	426	332	20	40	40	26	29	16	15	22
25	30/10/2021	1815	41	438	353	21	40	39	29	28	18	16	20
26	30/10/2021	1815	44	386	311	20	38	31	30	26	15	15	17
27	30/10/2021	1815	45	409	277	20	39	37	30	29	14	15	21
28	30/10/2021	1815	44	390	302	22	36	38	29	29	13	13	20
29	30/10/2021	1815	47	430	331	22	39	36	29	30	15	16	19
30	30/10/2021	1815	48	351	304	22	38	39	19	21	10	11	20
31	30/10/2021	1815	45	424	322	22	39	36	28	30	15	16	21
32	30/10/2021	1815	45	375	295	21	47	47	26	26	14	14	18
33	30/10/2021	1815	46	405	329	22	37	30	29	25	15	15	19
34	31/10/2021	1818	44	402	289	20	41	41	25	27	15	15	18
35	31/10/2021	1818	45	418	302	21	39	41	27	27	15	17	22
36	31/10/2021	1818	45	413	310	20	40	37	24	25	14	16	17
37	31/10/2021	1818	46	388	327	20	42	37	27	27	15	20	18
38	31/10/2021	1818	45	400	309	20	41	37	25	26	20	17	18
39	31/10/2021	1818	42	409	310	21	40	34	28	29	15	16	20
40	31/10/2021	1818	45	444	331	20	37	36	27	27	17	20	17

En el Cuadro 3 se puede observar que los caracteres morfométricos de los neonatos de *L. olivacea* en nidos artificiales del tortugario El Banco, Santa Rosa, Guatemala, tomados durante los meses de octubre y noviembre de 2021 siguen teniendo rangos similares entre cada carácter y no existieron cambios significativos con respecto al tamaño con el paso de los meses.

C. VARIABLES CLIMÁTICAS

Cuadro 4. Promedio de la temperatura en centígrados correspondientes al tercer trimestre termosensible de neonatos de *L. olivacea* evaluados en el tortugario El Banco, durante los meses de octubre y noviembre 2021.

Nido #	Media Temperatura (C°) del período termosensible (días 12-30 de incubación)	Cantidad Machos	Cantidad Hembras
1809	31.1	0	4
1810	31	0	2
1811	30.9	0	2
1813	31	0	4
1814	31	2	6
1815	31.4	1	12
1818	30.9	1	6

Los dataloggers medían la temperatura del nido cada hora durante 45 días. Las temperaturas se separaron en tres períodos y se realizó un promedio de las temperaturas que corresponden al final del primer tercio y al comienzo del segundo tercio. Se utilizó este período porque es el período de incubación en el que se define el sexo de los neonatos. Se puede observar que la temperatura de los nidos tiene un rango de 30.9 a 31.4°C para los meses de octubre y noviembre de 2021. Por otro lado, se puede observar que el nido que obtuvo la mayor cantidad de hembras corresponde al nido en donde la media de temperatura fue la más alta (31.4°C). Los nidos que obtuvieron la media de temperatura más baja (1818 y 1811) contaron con solo un macho en la nidada.

VII. DISCUSIÓN

Los tejidos de las gónadas difirieron en apariencia para *L. olivacea*. De hecho, muchas variables como la deshidratación del espécimen, la descomposición y la presencia de contaminación microbiana en el tejido muerto pueden influir en la morfología de la superficie y el color de la gónada. Según estudios realizados anteriormente, Ceriani y Wyneken mencionan que es posible que el sistema reproductivo relativamente subdesarrollado de los neonatos sea una expresión de una estrategia de crecimiento y que a causa de esto las tortugas marinas de caparazón duro crezcan más lento. Muchos estudios informan de que *Dermochelys coriacea*, una especie con un caparazón óseo muy reducido tiene la mayor tasa de crecimiento entre las tortugas marinas (Rhodin, 1985; Bels *et al.*, 1988; Zug y Parham, 1996). Por lo tanto, el desarrollo gonadal retrasado puede reflejar una estrategia de asignación de recursos utilizada por los quelonios (Ceriani y Wyneken, 2008). En las tortugas marinas, las tasas de mortalidad son inversamente proporcionales al tamaño de los juveniles (Musick y Limpus, 1997). La asignación de energía al crecimiento somático lento y a las gónadas podría disminuir las posibilidades de supervivencia durante las primeras etapas de la vida de *L. olivacea*. En estudios anteriores se observó que el color y la granularidad de las gónadas eran ambiguos (Van der Heiden *et al.*, 1985 Whitmore *et al.*, 1985; Wyneken *et al.*, 2007); En este estudio se encontró que también eran inconsistentes. Según Wyneken *et al.* 2007 informan que la forma de fijación de las gónadas al mesenterio es una característica específica del sexo para algunas especies, pero para este estudio no fue un diagnóstico para el sexado de los neonatos.

Las temperaturas dentro de los nidos de tortuga están influenciadas no solo por el clima global, sino por múltiples factores ambientales a escalas micro geográficas y micro temporales, de manera que las temperaturas experimentadas por los embriones en desarrollo, incluso durante el período termo sensible para la determinación del sexo (Valenzuela, 2008; Mitchell *et al.*, 2013 y Gómez-Saldarriaga *et al.*, 2016), se ven afectadas por las elecciones de las hembras en cuanto al lugar del nido. En algunos estudios controlados se ha establecido que la temperatura pivotal de *L. olivacea* en Costa Rica oscila entre 30 a 31°C (Wibbels, Rostal y Byles, 1998) y en Brasil se determinó que era de 30.7 °C (Casthologe *et al.*, 2018). En este estudio las temperaturas de incubación estuvieron dentro del rango o por encima de la temperatura pivotal (Cuadro 4). Este resultado podría sugerir que la temperatura pivotal de *L. olivacea* en Guatemala es menor a la establecida en Costa Rica y Brasil, por lo que es importante evaluar e implementar nuevas estrategias para disminuir la temperatura de incubación en los nidos artificiales del tortugario (González, 2020).

La temperatura del aire del ambiente es un factor crucial para la temperatura de los nidos, ya que calienta o enfría el suelo, afectando así a la supervivencia y al desarrollo sexual durante el período termo sensible de los taxones TSD (Janzen, 1994b; Bowen *et al.*, 2005; Warner y Shine, 2011), y puede ser un factor prevalente para los nidos situados en zonas sin vegetación en muchas especies como lo es en Guatemala. Según los datos morfométricos y de temperaturas (Cuadros 2, 3 y 4) que se obtuvieron en este estudio, se observa que a temperaturas ambientales más cálidas los neonatos de *L. olivacea* fueron más pequeños en longitud de caparazón curvado (CWC), lo que coincide entonces con la literatura. El aire y el agua más cálidos también pueden influir en la disponibilidad de alimentos para las hembras reproductoras y, en consecuencia, alterar la asignación de recursos a los huevos en las tortugas con determinación de sexo dependiente de temperatura (Hedrick *et al.*, 2021). La precipitación es otro factor que interactúa con la temperatura de incubación de tortugas marinas ya que contribuye a reducir la temperatura de los nidos y aumentar la producción de neonatos machos (Houghton *et al.*, 2007). La profundidad de los nidos es otro factor importante que altera la temperatura de estos, cabe resaltar que para este estudio no se tomó en cuenta ni se midió la profundidad de los nidos. Los nidos más profundos son más fríos que los nidos menos profundos y se ven menos afectados por las fluctuaciones extremas de temperatura perjudiciales para la viabilidad de las crías (Valenzuela, 2001a; Marco *et al.*, 2018).

Los seres humanos han alterado y destruido los hábitats naturales, lo que ha provocado una drástica disminución del terreno disponible para la anidación (Mainwaring *et al.*, 2017) y ha obligado a algunas especies de tortugas a tolerar la presencia humana en su hábitat de anidación, como lo es el caso de las tortugas parlama en Guatemala. La alteración del hábitat incluye el desarrollo urbano, que aumenta la radiación solar absorbida y, por tanto, eleva la temperatura de los paisajes urbanos (Yang *et al.*, 2016).

Las tortugas desempeñan papeles esenciales en el ecosistema, ocupando muchos nichos diferentes y únicos en todo el mundo. A medida que estas especies se dirigen hacia la extinción, sus comunidades se verán afectadas negativamente (Lovich *et al.*, 2018). Las tortugas con determinación de sexo dependiente de temperatura tienen pocas opciones para sobrevivir a una proporción de sexos muy sesgada y a una menor viabilidad de las crías en un mundo que se calienta. La larga vida general de las tortugas ofrece cierta amortiguación para estas proporciones de sexo sesgadas (Sabath *et al.*, 2016) y existe cierta heredabilidad para la adaptación a través de la temperatura umbral para el desarrollo sexual de los embriones con determinación de sexo por temperatura, la tasa de calentamiento probablemente excede el potencial evolutivo de muchos taxones de tortugas (Morjan, 2003). El aumento de la temperatura de la arena y los cambios en los patrones de precipitación hacen

necesario el desarrollo de estrategias e investigación que permitan la adaptación y optimización del manejo en tortugarios ante los efectos del cambio climático en el futuro (Micheli-Campbell *et al.*, 2011). Por lo tanto, algunas estrategias planteadas en otros estudios que podrían ser implementadas en Guatemala para la adaptación ante los efectos del cambio climático son: la irrigación de nidos y la proporción de sombra como posibles herramientas para disminuir la temperatura de incubación de los nidos artificiales de tortugas marinas (Hill *et al.*, 2015) y por otro lado sembrar los nidos a mayor profundidad para que la temperatura sea menor y los neonatos se vean menos afectados por las fluctuaciones de temperatura.

El objetivo de este estudio era encontrar un método fiable para identificar el sexo de las tortugas marinas neonatas muertas y conservadas, que suelen recogerse cuando se excavan los nidos tras la eclosión. Las características de las gónadas investigadas en estudios anteriores como el color y la granularidad no eran fiables para diferenciar a los machos de las hembras en la especie con la que se estaba trabajando. En el presente estudio el tamaño de la muestra fue baja debido a la cantidad total de neonatos eclosionados en la nidada, es posible que este tamaño de muestra tenga una influencia en los resultados. El método requiere instrumentación costosa y un protocolo largo. Este procedimiento, aunque requiere la fijación del espécimen, puede ser útil para identificar el sexo de las crías muertas en las colecciones de museos, así como de las que se recogen en las nidadas (un componente común de la gestión y el seguimiento de los nidos de tortugas marinas). Algunas mejoras que pueden implementarse es tomar solamente a los neonatos que estén en buenas condiciones y asegurarse de que no estén en descomposición, ya que el tomar las muestras de las gónadas puede ser más complicado y puede existir la posibilidad de que las gónadas no estén en buenas condiciones para ser analizadas. Además, este estudio conduce a una mejor comprensión de la ontogenia temprana de los sistemas reproductivos de las tortugas marinas jóvenes, y sugiere criterios que pueden funcionar para el análisis de otras especies (Ceriani y Wyneken, 2008). Asimismo, es necesario realizar más estudios en los tortugarios de Guatemala para poder tomar acciones que permitan tener un equilibrio de sexos en las nidadas futuras.

VIII. CONCLUSIONES

El método de Wyneken, J *et al.* (2007) fue efectivo en la determinación histológica de sexo en neonatos de tortuga parlama (*Lepidochelys olivacea*).

El 93% de los neonatos de *L. olivacea* evaluados del tortugario El Banco durante el 2021 fueron hembras de acuerdo con el análisis histológico de sus gónadas (n = 60).

El 7% de los neonatos de *L. olivacea* evaluados del tortugario El Banco durante el 2021 fueron machos de acuerdo con el análisis histológico de sus gónadas (n = 60).

IX. RECOMENDACIONES

Realizar estudios sobre cómo influye o puede afectar el agua, la temperatura del aire y del suelo, a las condiciones que experimentan los embriones en desarrollo en los nidos de los tortugarios de Guatemala.

Contar con registros de temperatura de incubación de nidos en playas naturales como en camas de arena artificial, con el objetivo de conocer el ratio de sexos de la población, y así conocer la relación ecológica entre machos y hembras, para esta especie, y así mejorar el manejo del proyecto en la zona.

Realizar un examen de los niveles de estrógeno y testosterona en la sangre o el fluido corioalantónico y amniótico por medio de radioinmunoanálisis para neonatos de *L. olivacea* en Guatemala.

Actualmente en el Tortugario El Banco los nidos se siembran a una profundidad de 30 cm, se podría considerar sembrar los nidos a mayor profundidad (50 cm).

Contar con manuales de manejo que incluyan mejoras o cambios con respecto a la temperatura de los nidos, irrigación y profundidad de siembra de estos mismos.

No se recomienda realizar el análisis histológico si el espécimen tiene muy avanzado el proceso de descomposición, ya que esto puede llegar a afectar la morfología de las gónadas.

X. BIBLIOGRAFÍA

Arcas. (2015). *Guía para la conservación de las tortugas marinas en Guatemala, con énfasis en el manejo de tortugarios*. Nueva Guatemala de la Asunción. Guatemala. 11pp.

Ariano-Sánchez, D., Muccio C., Rossel, F., y Reinhardt, S. (2020). *Are trends in Olive Ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) nesting abundance affected by El Niño Southern Oscillation (ENSO) variability? Sixteen years of monitoring on the Pacific coast of northern Central America*. *Global Ecology and Conservation* 24 (2020) e01339

Bézy, V., Valverde, R., y Plante, C. (2015). *Olive ridley sea turtle hatching success as a function of the microbial abundance in nest sand at Ostional, Costa Rica*. *PLoS one*, 10(2), e0118579.

Bowen, B., y Karl, S. (2007). *Population genetics and phylogeography of sea turtles*. *Molecular ecology*, 16(23), 4886-4907.

Bowen, K. D., Spencer, R.-J., y Janzen, F. J. (2005). *A comparative study of environmental factors that affect nesting in Australian and North American freshwater turtles*. *J. Zool.* 267, 397–404. doi: 10.1017/S0952836905007533

Bull, J. J. (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California.

Casthelo, V., Dos Santos, M., Castilhos, J., Filho, P., Gomes, L., Clemente, R., y Ferreira, P. (2018). *Pivotal Temperature and Hatchling Sex Ratio of Olive Ridley Sea Turtles *Lepidochelys olivacea* from the South Atlantic Coast of Brazil*. *Herpetological Conservation and Biology*, 13(2), 488–496.

Ceriani, S. y Wyneken, J. (2008). *Comparative morphology and sex identification of the reproductive system in formalin-preserved sea turtle specimens*. *Zoology* doi: 10.1016/j.zool.2007.07.007

Chaudhari, S., Prasad, K., y Shanker, K. (2009). *Impact of casuarina plantations on olive ridley turtle nesting along the Northern Tamil Nadu Coast*. India: ATREE.

CONAP. (2010). *Guía para la conservación de las tortugas marinas de Guatemala, con énfasis en el manejo de tortugarios*. Nueva Guatemala de la Asunción. Guatemala. 61pp.

Consejo Nacional de Áreas protegidas (CONAP). (2018). *RESOLUCIÓN 03-17-2017. Normativo para el manejo y conservación de tortugas marinas*. Guatemala: Consejo Nacional de Áreas Protegidas.

Cortés-Gómez, A. A., Romero, D., y Girondot, M. (2018). Carapace asymmetry: *A possible biomarker for metal accumulation in adult olive Ridley's marine turtles?*. *Marine pollution bulletin*, 129(1), 92-101.

Doug, Perrine. (2003). *Sea turtles of the world*. Voyageur Press, Inc. USA. 144pp.

Eckert, KL; Bjorndal, KA; Abreu Grobois, FA y Donnelly, M. (2001). *Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas*. Estados Unidos, Grupo especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. 68p.

Eguchi, T., Gerrodette, T., Pitman, R.L., Seminoff, J.A. y Dutton, P.H., (2007). *At-sea density and abundance estimate of the olive ridley turtle *Lepidochelys olivacea* in the eastern tropical Pacific*. *Endanger. Species Res.* 3, 191e203.

Fonseca, L.G., Murillo, G.A., Guadamúz, L., Spínola, R.M., Valverde, R.A. (2009). *Downward but stable trend in the abundance of arribada Olive Ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) at Nancite Beach, Costa Rica (1971e2007)*. *Chelonian Conserv. Biol.* 8, 19e27.

García, A., Ceballos, G., Adaya, R. (2003). *Intensive beach management as an improved sea turtle conservation strategy in Mexico*. *Biol. Conserv.* 253e261.

Girondot, M., Monsinjon, J., y Guillon, J. (2018). *Delimitation of the embryonic thermosensitive period for sex determination using an embryo growth model reveals a potential bias for sex ratio prediction in turtles*. *Journal of Thermal Biology* 73 (2018) 32-40.

Godfrey, M., y Mrosovsky N. (1999). *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication 4, Blanchard, Pennsylvania, U.S.A.

Godbley, B. J., A. C. Broderick, y N. Mrosovsky. (2001) *Estimating hatchling sex ratios of loggerhead turtles in Cyprus from incubation durations*. *Marine Ecology Progress Series* 210:195–201.

Godbley, B. J., A. C. Broderick, J. R. Downie, F. Glen, J. D. Houghton, I. Kirkwood, S. Reece, y G. C. Hays. (2001b). *Thermal conditions in nests of loggerhead turtles: further evidence suggesting female skewed sex ratios of hatchling production in the Mediterranean*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263:45–63.

Gómez-Saldarriaga, C., Valenzuela, N., y Ceballos, C. P. (2016). *Effects of incubation temperature on sex determination in the endangered Magdalena river turtle, *Podocnemis lewyana**. *Chelonian Conserv. Biol.* 15, 43–53. doi: 10.2744/CCB-1170.1

Hays, G. C., Mazaris, A. D., Schofield, G., y Laloë, J.-O. (2017). *Population viability at extreme sex-ratio skews produced by temperature-dependent sex determination*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284:20162576. doi: 10.1098/rspb.2016.2576

Hedrick, A. R., Greene, D. U., Lewis, E. L., Hood, A. S., y Iverson, J. B. (2021). Climate effects on nesting phenology in Nebraska turtles. *Ecol. Evol.* 11, 1225–1239. doi: 10.1002/ece3.7105

Hitz, S. y Smith, J. (2004). *Estimating global impacts from climate change*. *Global Environmental Change* 14, 201-218.

Holmgren, M., Schefer, M., Ezcurra, E., Gutiérrez, J. y Morhen, G. (2001). *El Niño effects on the dynamics of terrestrial ecosystems*. *Trends in ecology and evolution* 16 (2), 89-92.

Houghton, J. D., Myers, A. E., Lloyd, C., King, R. S., Isaacs, C., y Hays, G. C. (2007). *Protracted rainfall decreases temperature within leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) clutches in Grenada, West Indies: ecological implications for a species displaying temperature dependent sex determination*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 345(1), 71-77.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). (2007). *Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los grupos de trabajo I, II y III para el cuarto informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*. Ginebra, Suiza: Organización Meteorológica Mundial (OMM) y Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). (2014). *Earth's ecosystems*. In IPCC y C. McMullen (Eds.), *Climate Change Science Compendium*. New York: Author.

Janzen, F. J. (1994b). *Vegetational cover predicts the sex ratio of hatchling turtles in natural nests*. *Ecology* 75, 1593–1599. doi: 10.2307/1939620

Juarez, R., Muccio, C., (1997). *Sea turtle conservation in Guatemala*. *Mar. Turt. Newsl.* 77, 15e17.

Luna, J.R., Hermosilla, C., Flores, O., Romero, J. y M. Gómez. (2008). *Vulnerabilidad de la Costa del Pacífico ante un posible ascenso del nivel del mar*. Centro de Estudios Superiores de Energía y Minas. Universidad de San Carlos de Guatemala. 17 pp.

Lovich, J. E., Ennen, J. R., Agha, M., y Gibbons, J. W. (2018). *Where have all the turtles gone, and why does it matter?* *Bioscience* 68, 771–781. doi: 10.1073/pnas.0801859105

Marco, A., Abella, E., Martins, S., López, O., y Patino-Martínez, J. (2018). *Female nesting behaviour affects hatchling survival and sex ratio in the loggerhead sea turtle: implications for conservation programmes*. *Ethol. Ecol. Evol.* 30, 141–155. doi: 10.1111/brv.12317

Mainwaring, M. C., Barber, I., Deeming, D. C., Pike, D. A., Roznik, E. A., y Hartley, I. R. (2017). *Climate change and nesting behaviour in vertebrates: a review of the ecological threats and potential for adaptive responses*. *Biol. Rev.* 92, 1991–2002. doi: 10.1093/biosci/biy095

Miller, J. D. (1997). Reproduction in Sea Turtles. Pp. 51–81. In P. L. Lutz and J. A. Musick (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.

Micheli-Campbell, M. A., Campbell, H., Cramp, R., Booth, D., y Franklin, C. (2011). *Staying cool, keeping strong: incubation temperature affects performance in a freshwater turtle*. *Journal of Zoology*, 285(4), 266-273.

Michel-Morfin, J., Gómez, V., y Navarro, C. (2001). Morphometric Model for Sex Assessment in Hatchling Olive Ridley Sea Turtles. *Chelonia Conservation and Biology*, 4(1):53.

Mitchell, T. S., Maciel, J. A., y Janzen, F. J. (2013). *Does sex-ratio selection influence nest-site choice in a reptile with temperature-dependent sex determination?* *Proc. Biol. Sci.* 280:20132460. doi: 10.1655/D-18-00001

Musick, J.A., Limpus, C.J. (1997). Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 137–163.

Montero, N., dei Marcovaldi, M. A., Lopez–Mendilaharsu, M., Santos, A. S., Santos, A. J., y Fuentes, M. M. (2018). Warmer and wetter conditions will reduce offspring production of hawksbill turtles in Brazil under climate change. *PLoS One*, 13(11), e0204188.

Morjan, C. L. (2003). *How rapidly can maternal behavior affecting primary sex ratio evolve in a reptile with environmental sex determination?* *Am.Nat.* 162, 205–219. doi: 10.2307/1565908

Mrosovsky, N. (1994). Sex ratio of sea turtles. *The Journal of Experimental Zoology* 270: 16 - 27.

Neuwald, J. L. y N. Valenzuela. (2011). The lesser known challenge of climate change: Thermal variance and sex-reversal in vertebrates with temperature-dependent sex determination. *PLOS One* 6: 1-9.

Peavey, L.E., Popp, B.N., Pitman, R.L., Gaines, S.D., Arthur, K.E., Kelez, S., Seminoff, J.A. (2017). Opportunism on the high seas: foraging ecology of Olive Ridley turtles in the eastern Pacific ocean. *Front. Mar. Sci.* 4, 1e14.

Polovina, J.; Balazs, G.; Howell, E.; Parker, D.; Seki, M. y Dutton P. (2004). *Forage and migration habitat of loggerhead (Caretta caretta) and olive ridley (Lepidochelys olivacea) sea turtles in the central North Pacific Ocean*. Blackwell Publishing Ltd. FISHERIES OCEANOGRAPHY. 13: I, 36-51, 2004.

Rand, A. S., y Dugan, B. (1983). *Structure of complex iguana nests*. *Copeia* 1983, 705–711. doi: 10.1007/s12038-007-0123-z

Rueda Almonacid, JV; Rodríguez Mahecha; JV; Mast, RB; Mittermeier, RA. (2007). Tortugas marinas de América. Colombia, Conservación Internacional. 12 p.

Rhodin, A.G.J. (1985). *Comparative chondro-osseous development and growth of marine turtles*. *Copeia* 3, 752–771.

Sabath, N., Itescu, Y., Feldman, A., Meiri, S., Mayrose, I., y Valenzuela, N. (2016). Sex determination, longevity, and the birth and death of reptilian species. *Ecol. Evol.* 6, 5207–5220. doi: 10.1643/0045-8511(2003)003[0326:RCOFMP]2.0.CO;2

Santidrián Tomillo, P., Roberts, S. A., Hernández, R., Spotila, J. R., y Paladino, F. V. (2015). Nesting ecology of East Pacific green turtles at Playa C abuyal, Gulf of Papagayo, Costa Rica. *Mar. Ecol.* 36, 506–516. doi: 10.1002/ece3.2277

Troëng, S., Rankin, E. (2005). *Long-term conservation efforts contribute to positive green turtle Chelonia mydas nesting trend at Tortuguero, Costa Rica*. *Biol. Conserv.* 121, 111e116.

Valenzuela, N. (2001a). *Constant, shift, and natural temperature effects on sex determination in Podocnemis expansa turtles*. *Ecology* 82, 3010–3024. doi: 10.1017/S1464793106007032

Valenzuela, N.(2008c). *Sexual development and the evolution of sex determination*. *Sexual Development* 2: 64-72.

Valenzuela, N. y V. A. Lance (Eds.). (2004). *Temperature dependent sex determination in vertebrates*. Smithsonian Books, Washington, D. C. 194 pp.

Van der Heiden, A.M., Brisen o-Duen~ as, R., Rios-Olmeda, D. (1985). *A simplified method for determining sex in hatchling sea turtles*. *Copeia* 3, 779–782.

Velo-Antón, G., Becker, C. G., y Cordero-Rivera, A. (2011). Turtle carapace anomalies: the roles of genetic diversity and environment. *PLoS One*, 6(4), e18714.

Warner, D. A., y Shine, R. (2011). *Interactions among thermal parameters determine offspring sex under temperature-dependent sex determination*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 256–265.

Wibbels, T., Rostal, D., y Byles, R. (1998). *High pivotal temperature in the sex determination of the olive ridley sea turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Playa Nancite, Costa Rica*. *Copeia*, 1998(4), 1086-1088.

Wyneken, J., *et al.* (2007). *Determining sex in post hatchling loggerhead sea turtles using multiple gonadal and accessory duct characteristics*. *Herpetologica*, 63(1), 19-30.

Yang, L., Qian, F., Song, D.-X., y Zheng, K.-J. (2016). *Research on urban heat-island effect*. *Proc. Eng.* 169, 11–18. doi: 10.1038/s41561-019-0322-x

XI. ANEXOS

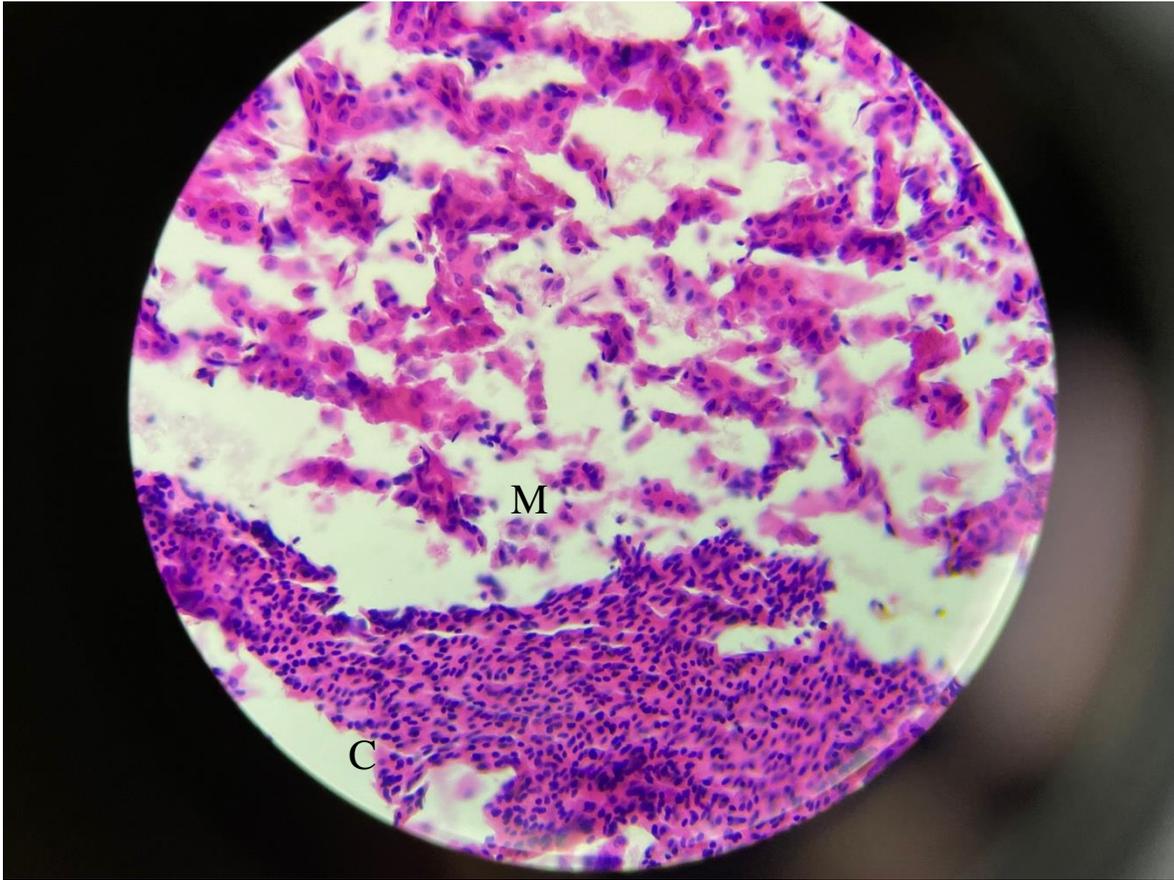


Figura 8. Ovario de individuo #2 del nido 1810 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

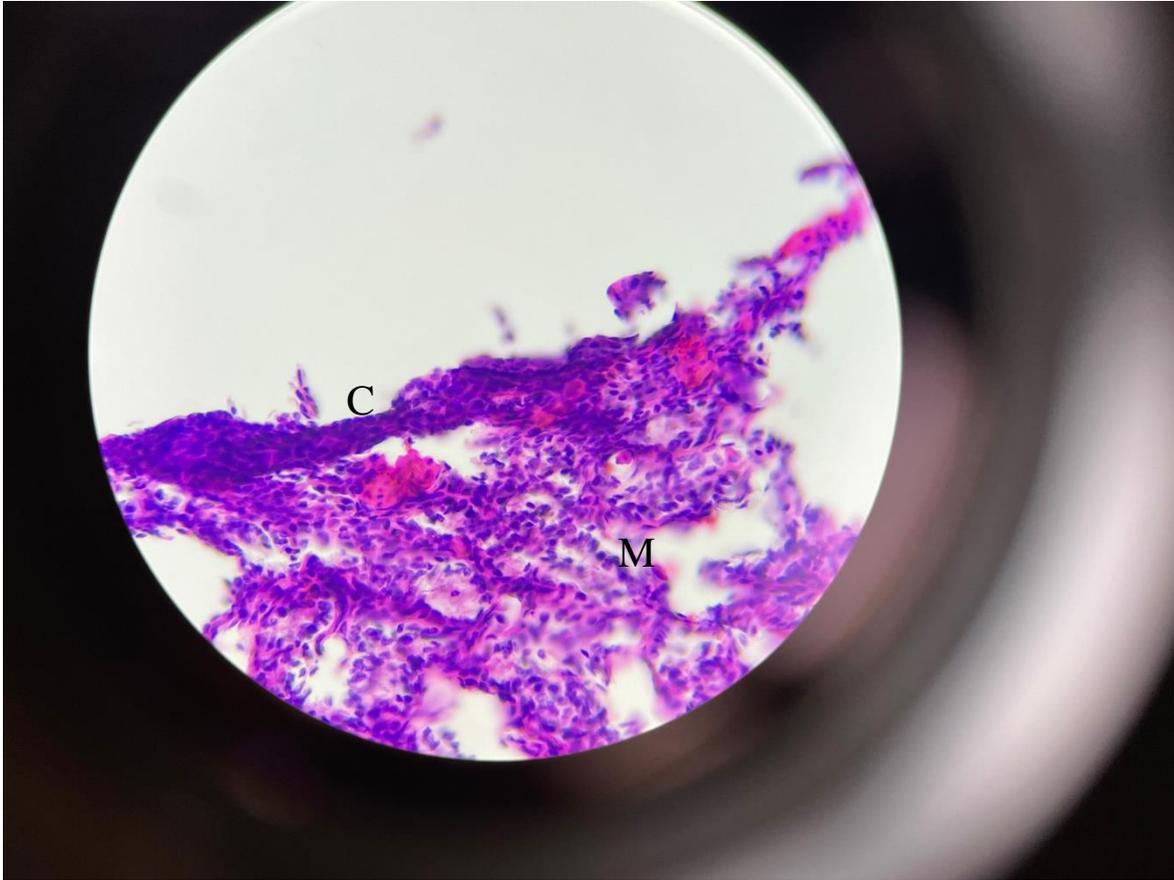


Figura 9. Ovario de individuo #3 del nido 1810 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

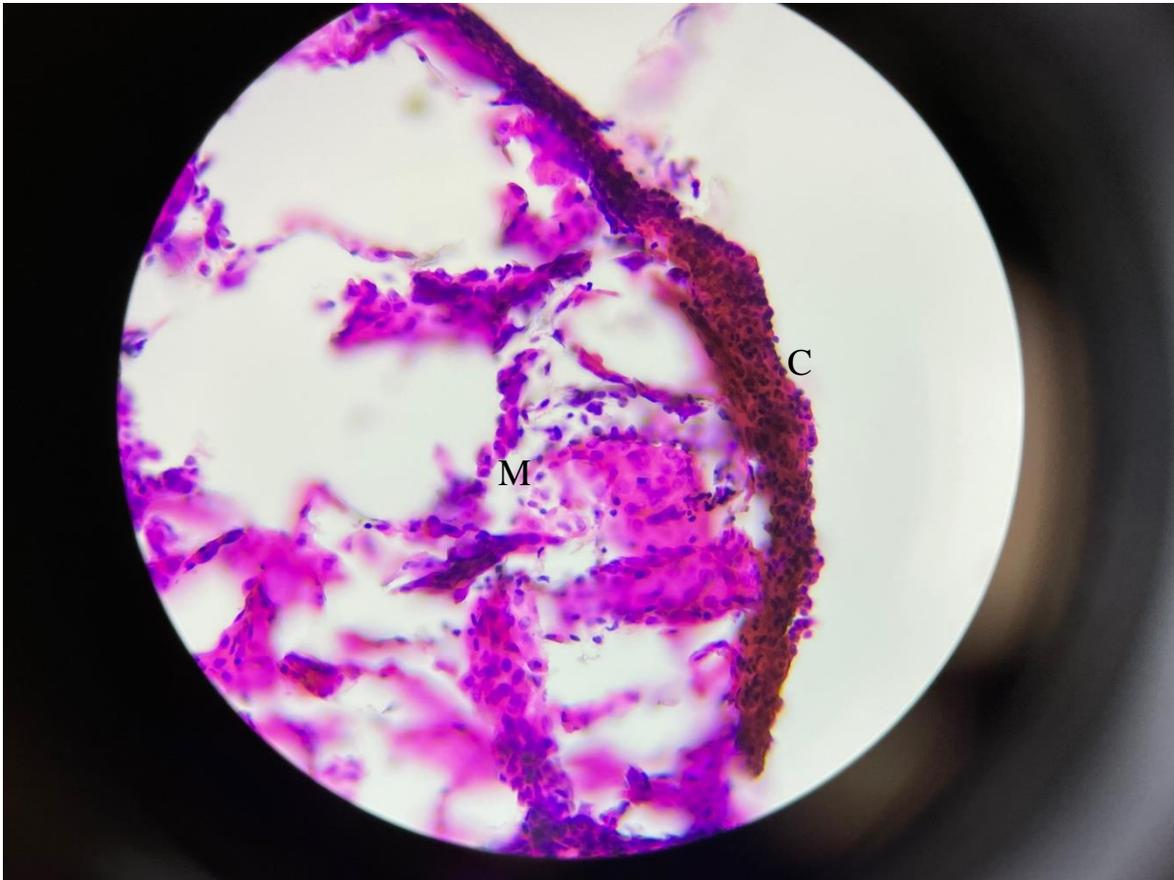


Figura 10. Ovario de individuo #4 del nido 1811 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

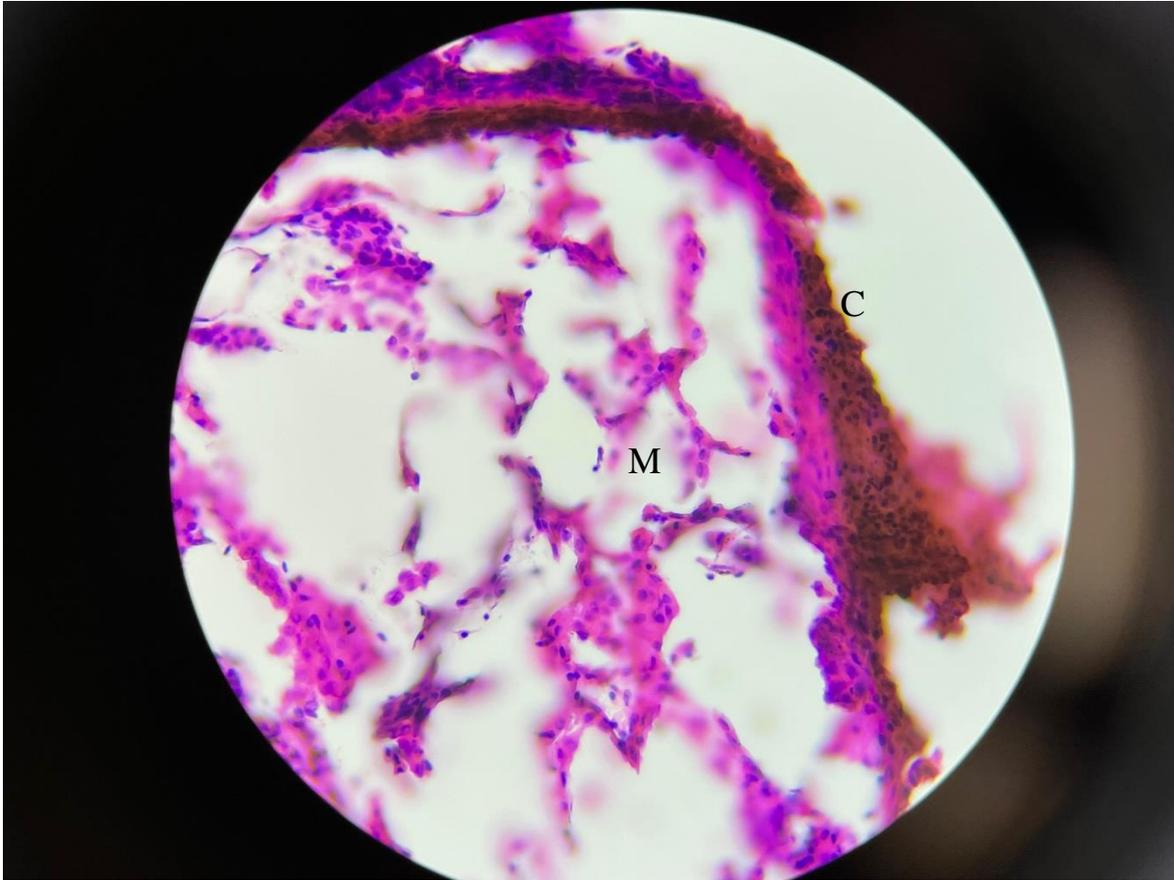


Figura 11. Ovario de individuo #5 del nido 1811 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

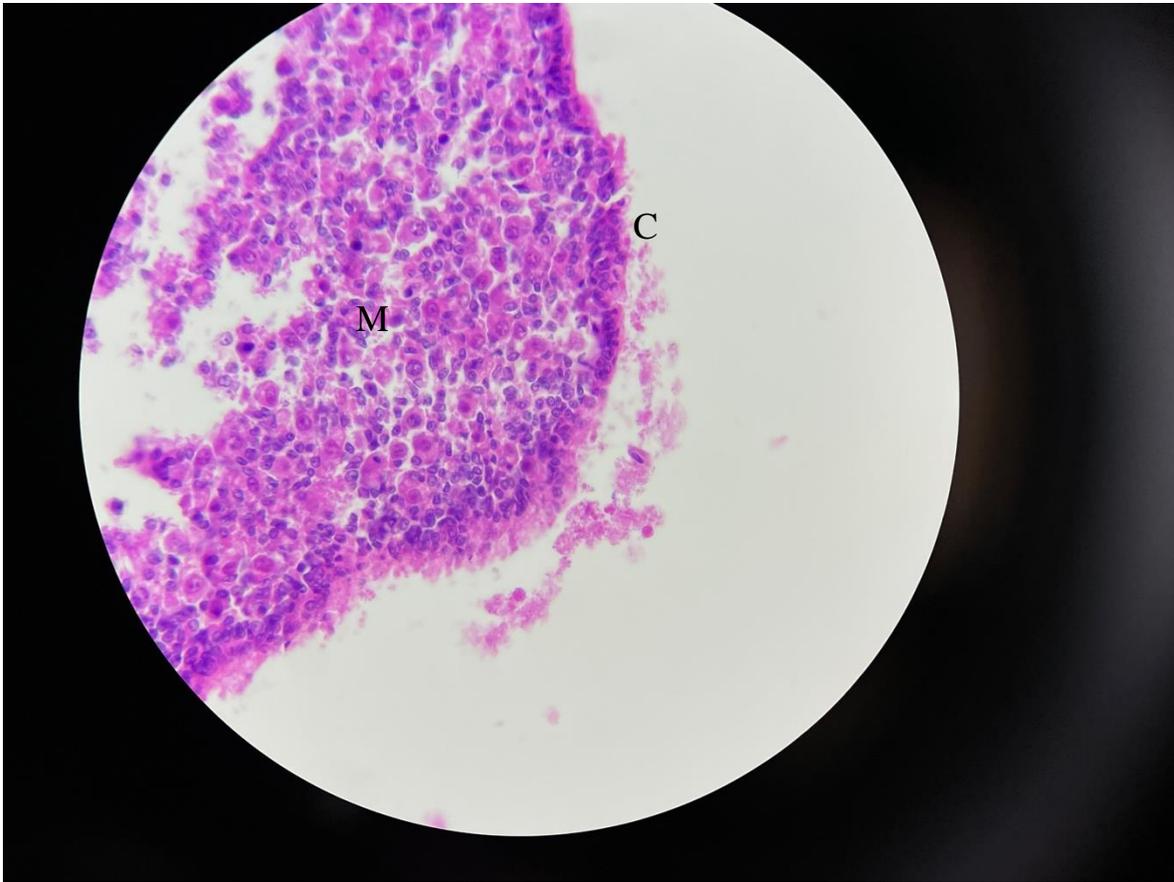


Figura 12. Ovario de individuo #2 del nido 1813 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

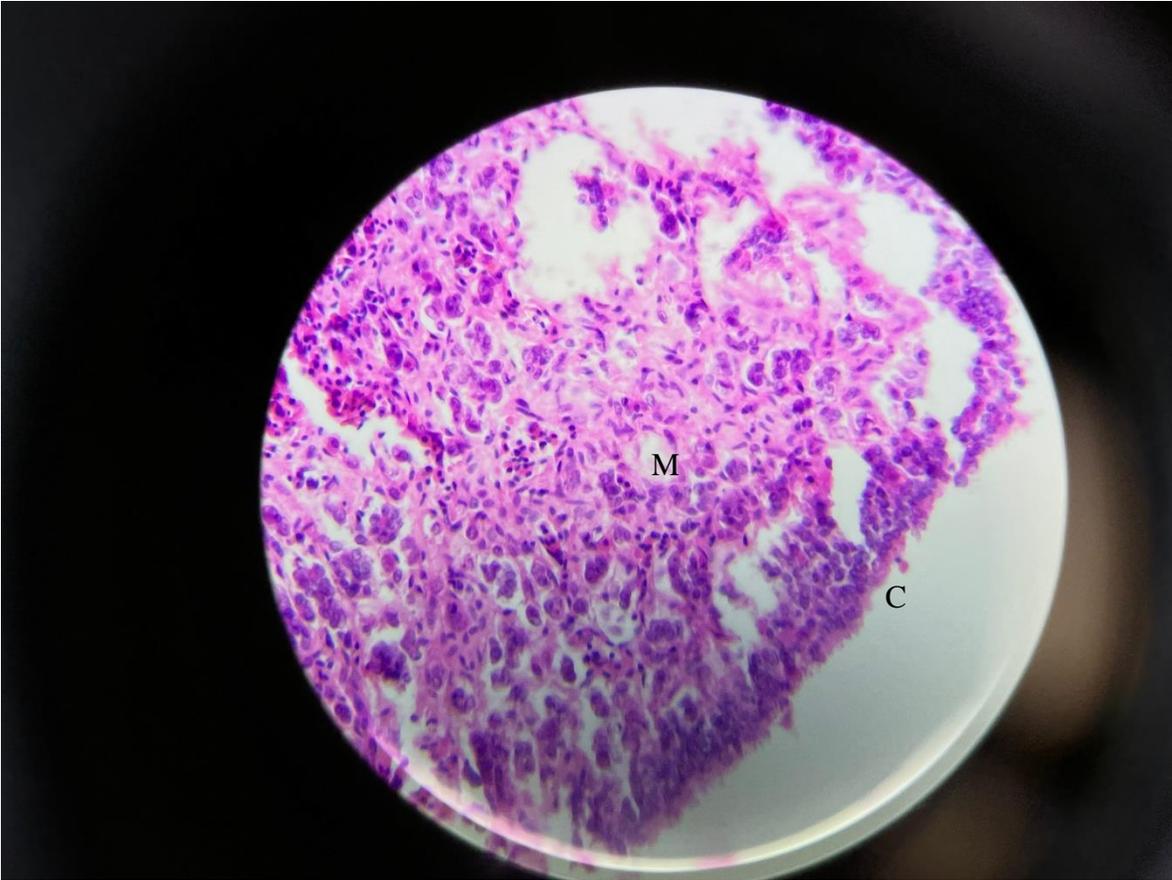


Figura 13. Ovario de individuo #4 del nido 1813 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

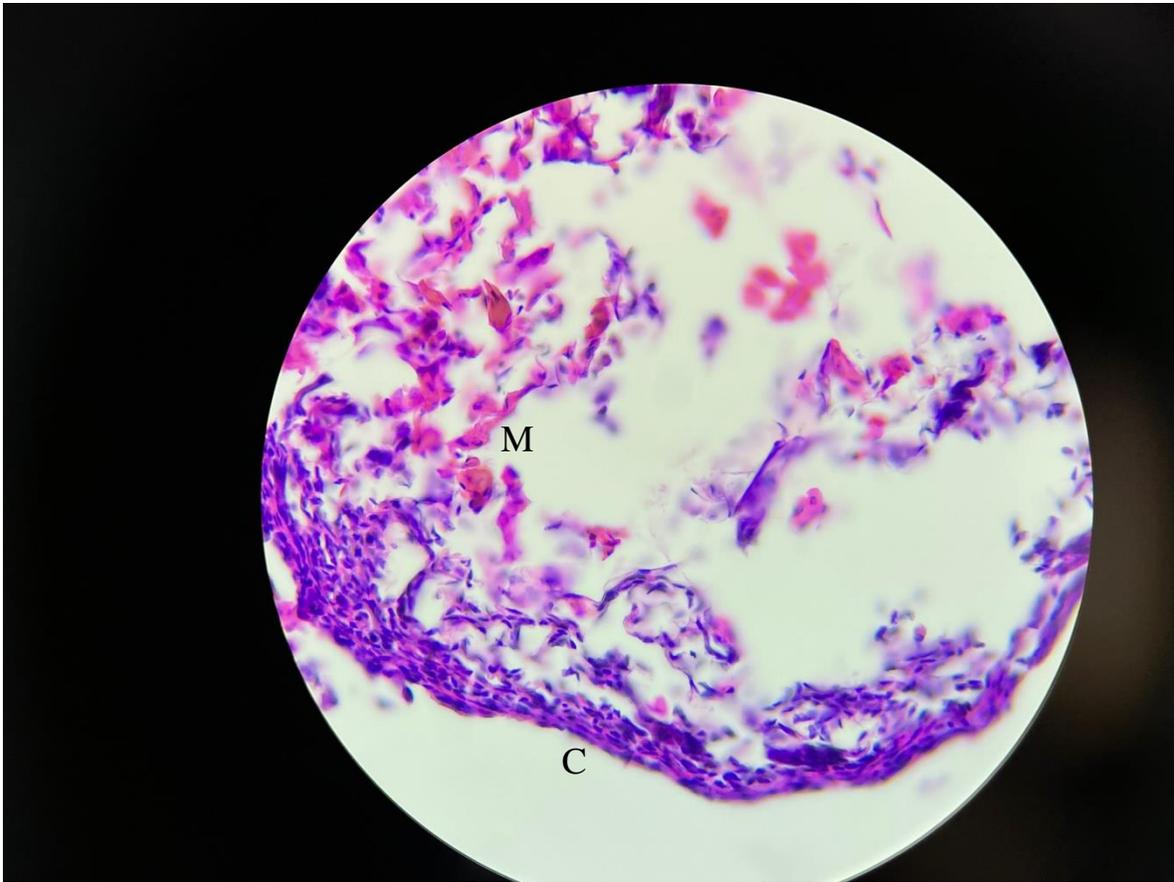


Figura 14. Ovario de individuo #1 del nido 1813 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

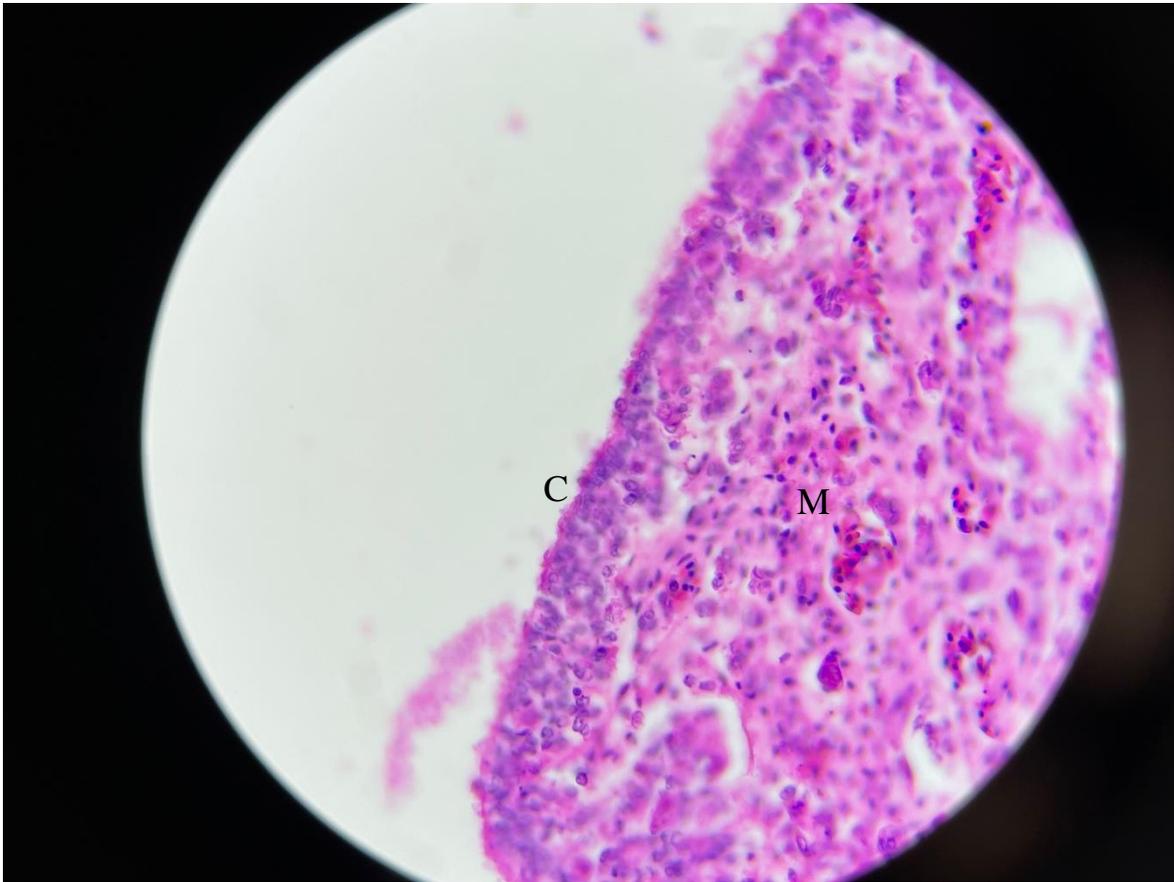


Figura 15. Ovario de individuo #3 del nido 1813 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

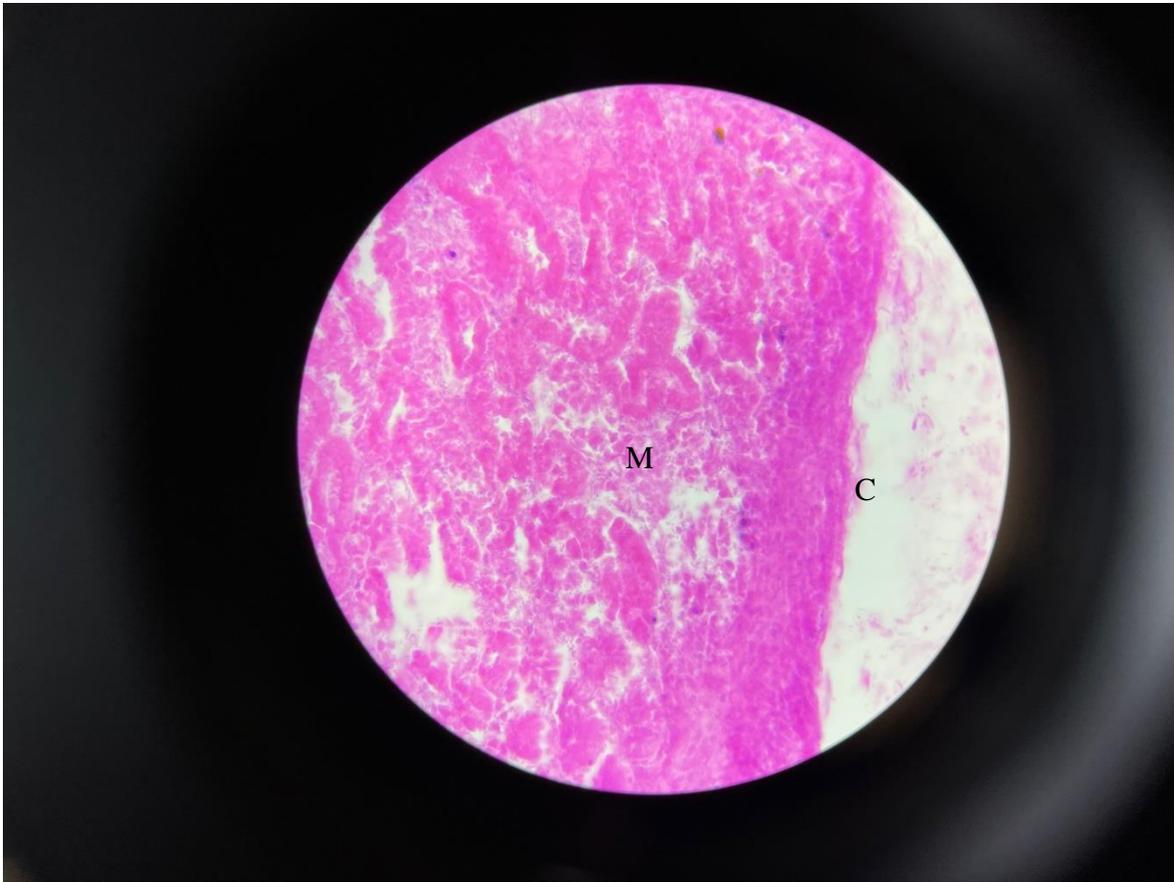


Figura 16. Ovario de individuo #1 del nido 1814 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M).

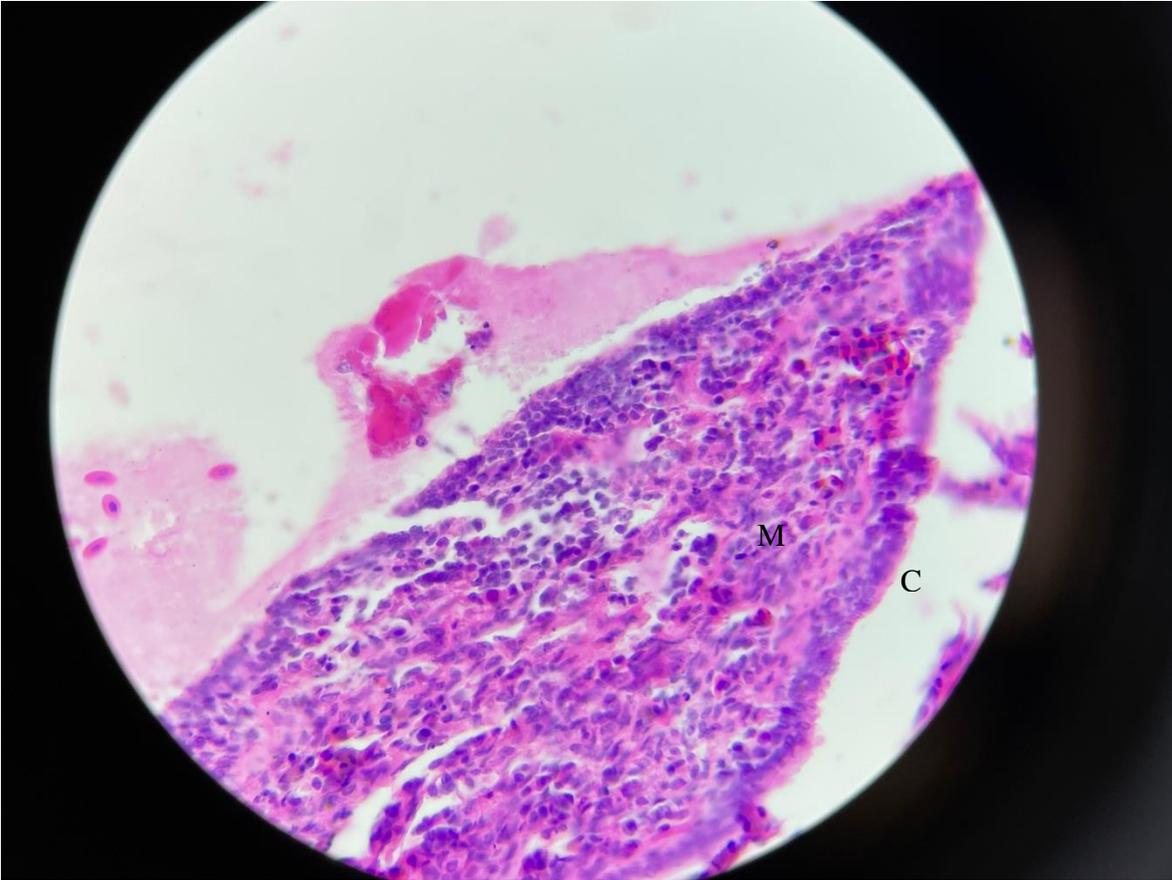


Figura 17. Ovario de individuo #3 del nido 1814 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

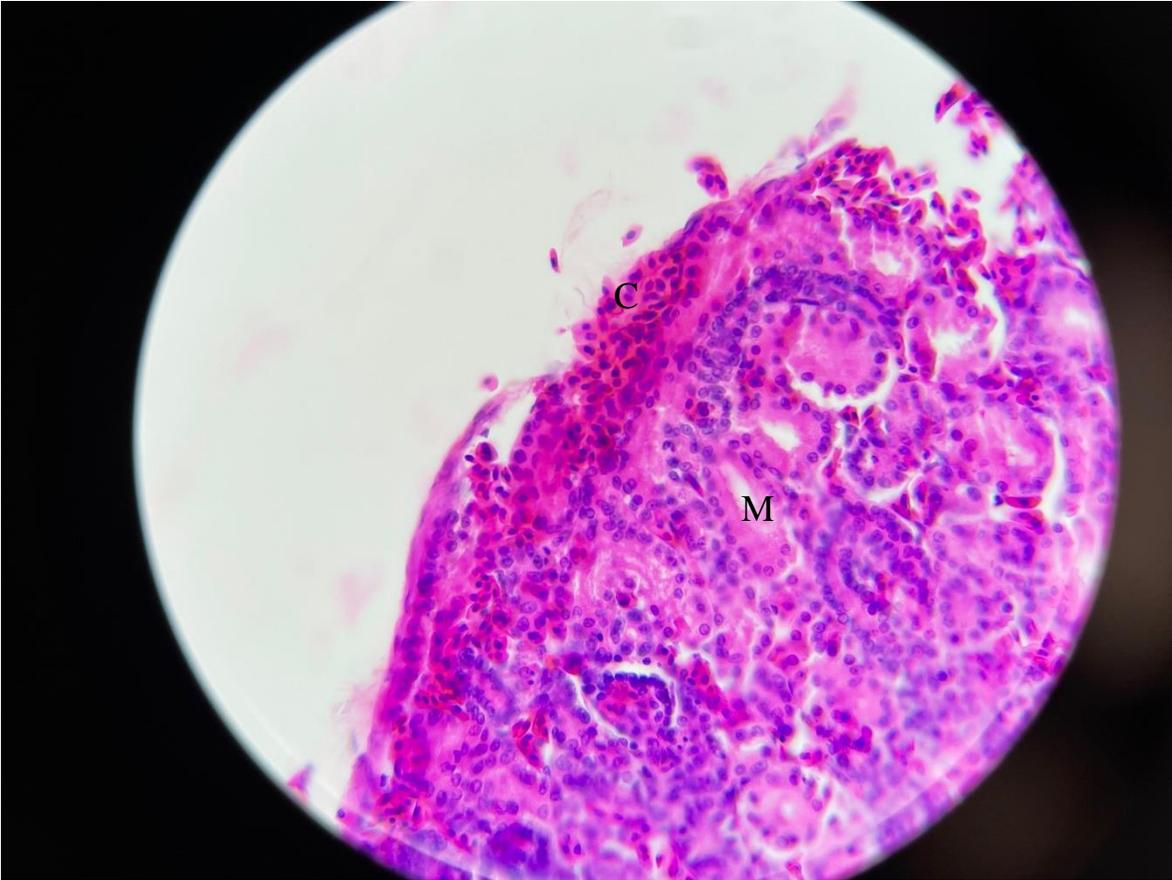


Figura 18. Testículo de individuo #7 del nido 1814 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza poco desarrollada (C) y una médula organizada (M). 40X

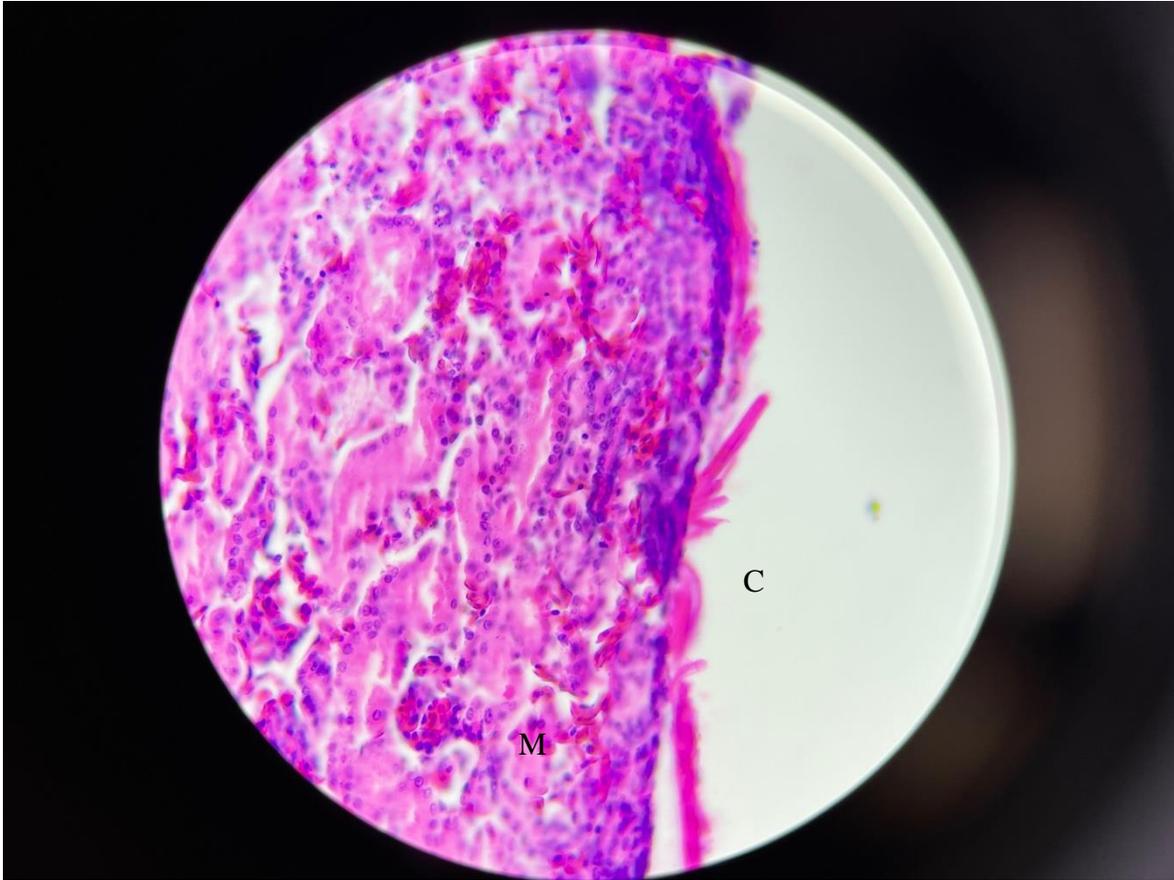


Figura 19. Testículo de individuo #20 del nido 1814 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza poco desarrollada (C) y una médula organizada (M). 40X

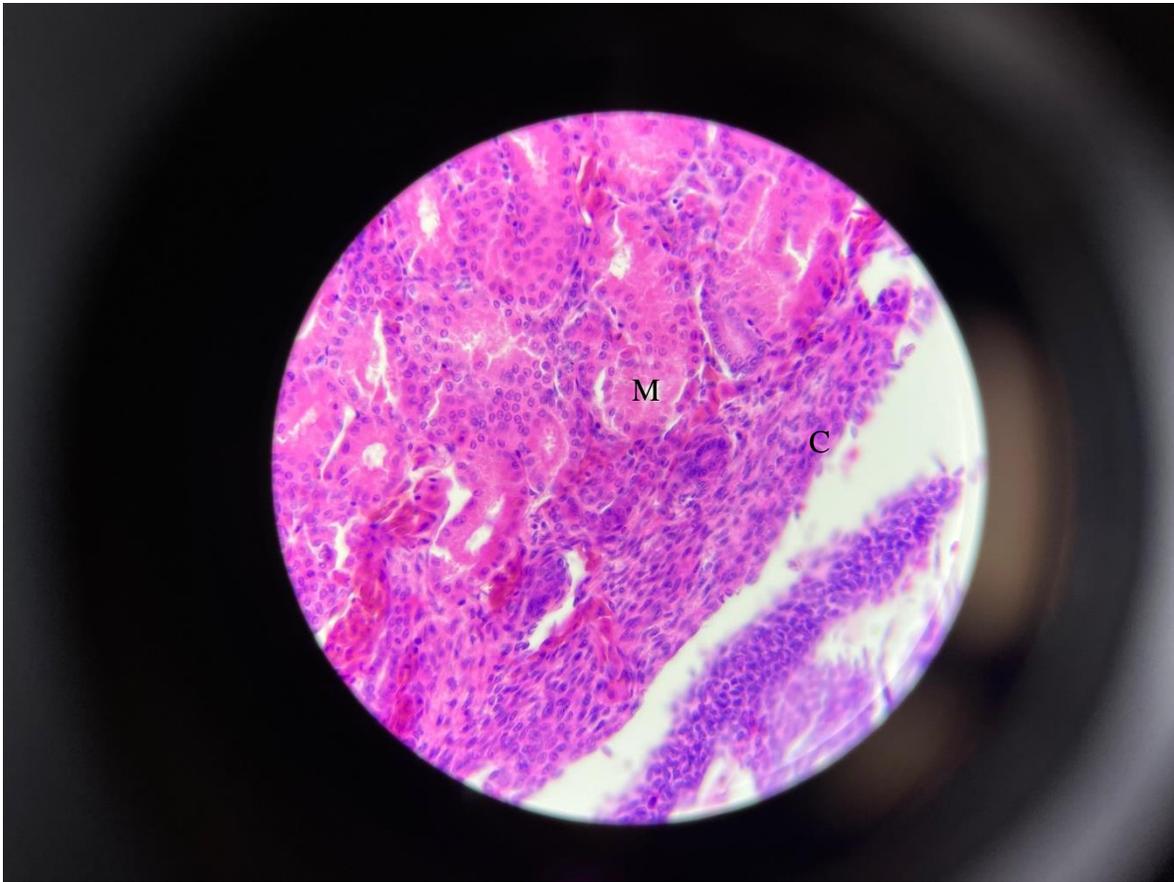


Figura 20. Ovario de individuo #1 del nido 1814 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

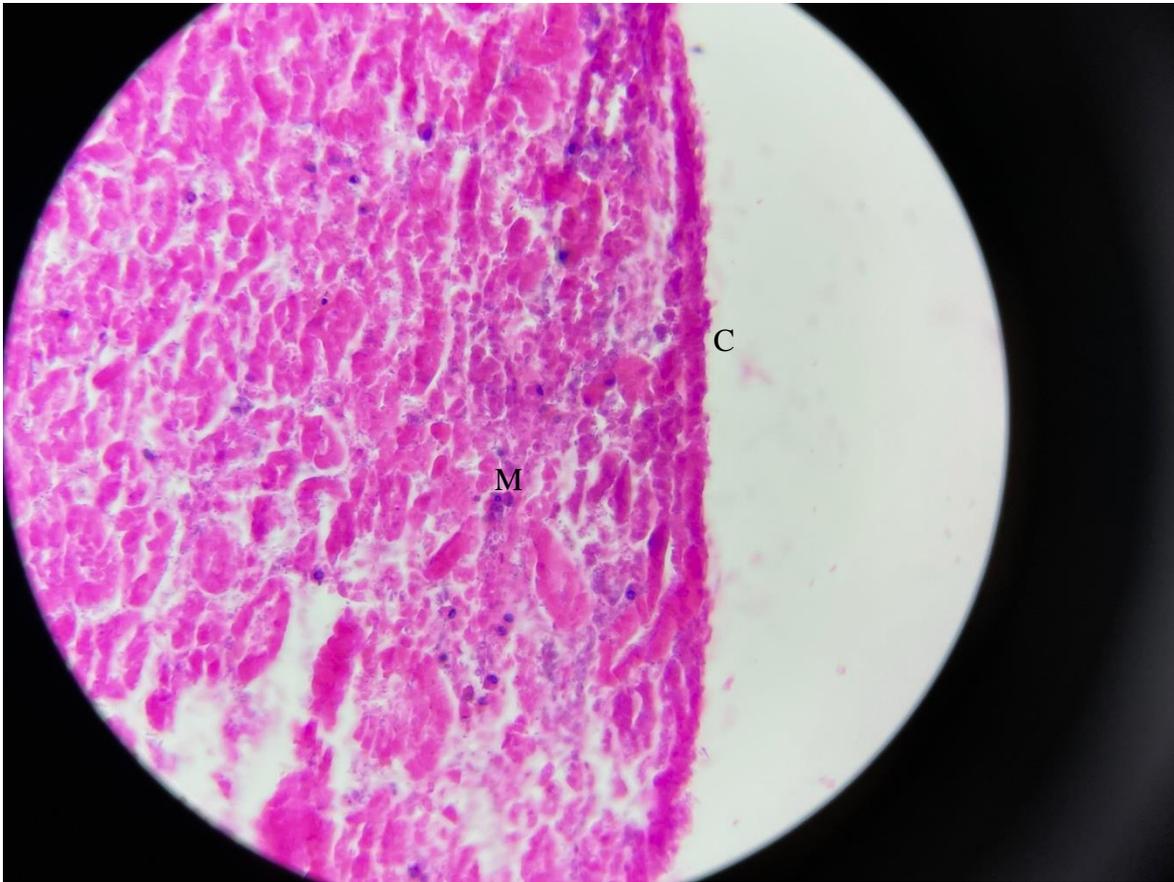


Figura 21. Ovario de individuo #2 del nido 1814 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

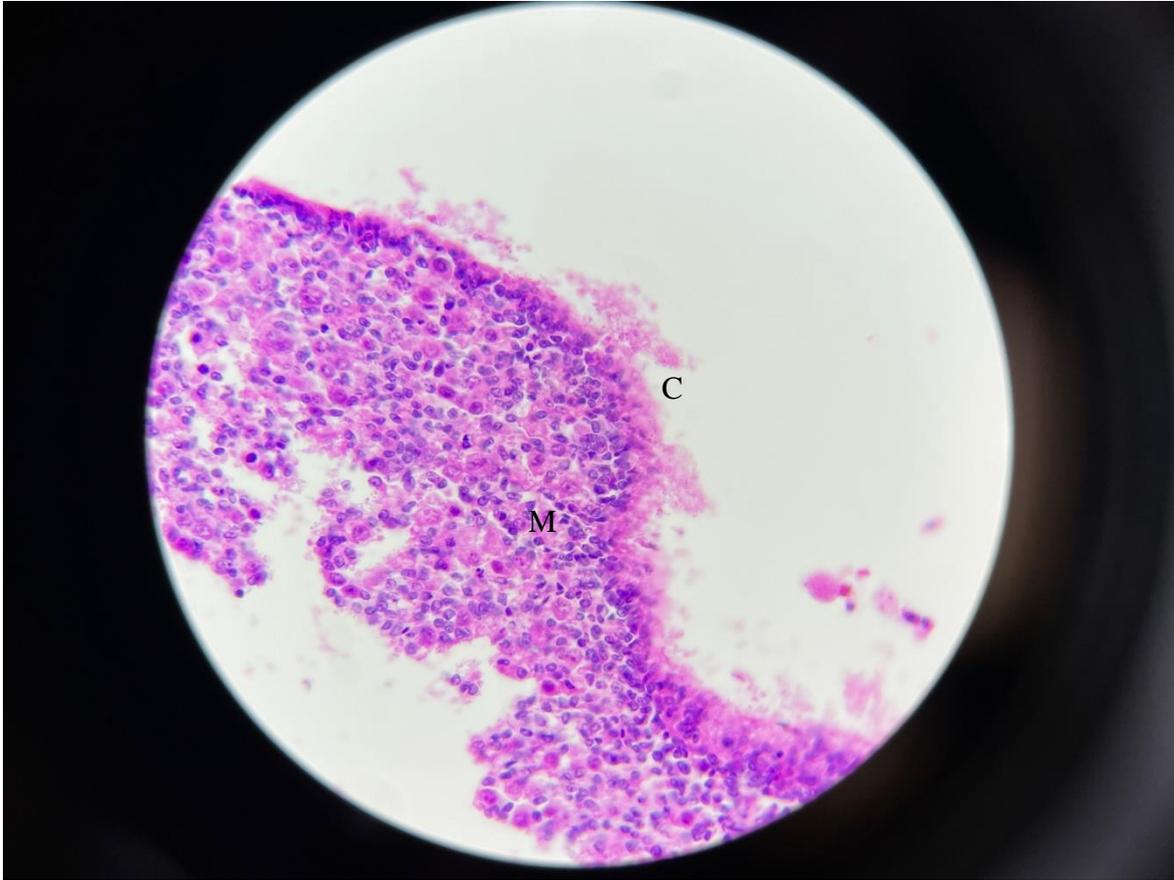


Figura 22. Ovario de individuo #3 del nido 1814 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

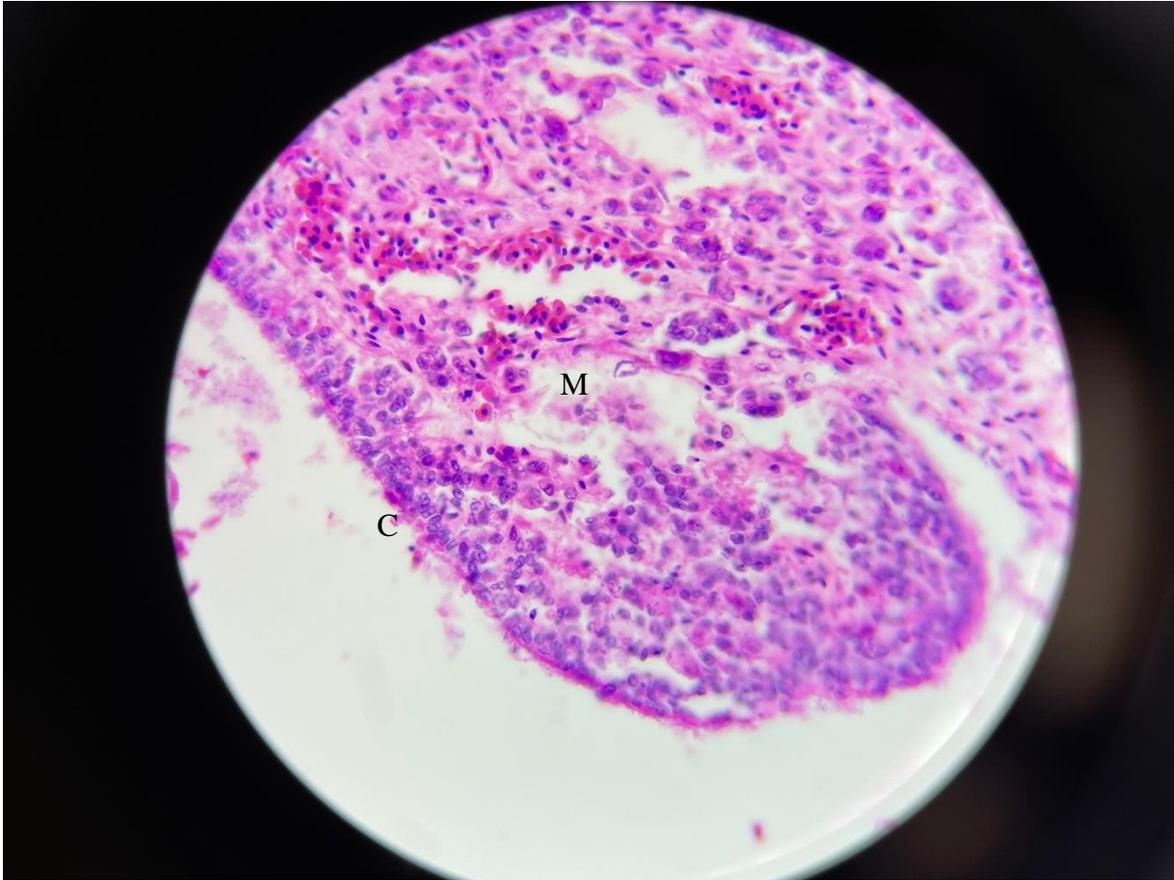


Figura 23. Ovario de individuo #5 del nido 1814 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

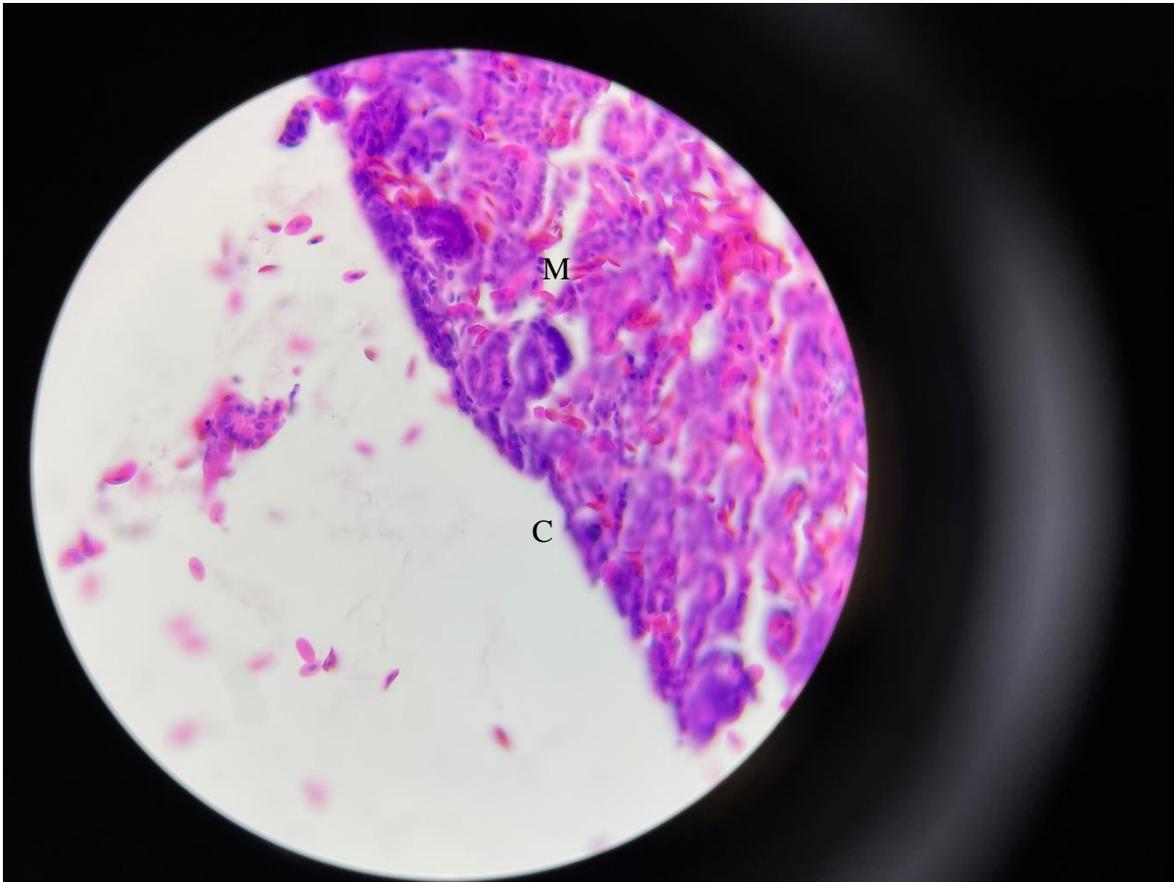


Figura 24. Ovario de individuo #6 del nido 1809 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

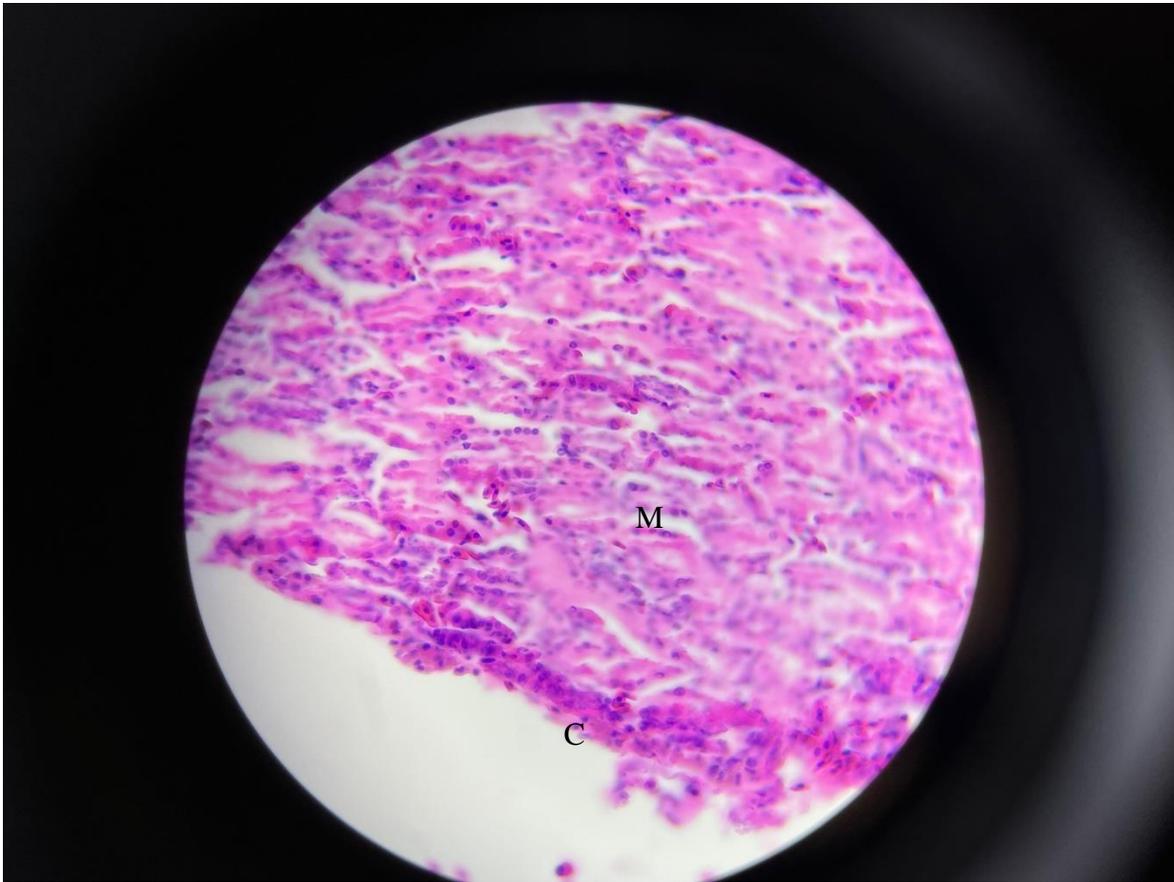


Figura 25. Ovario de individuo #14 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

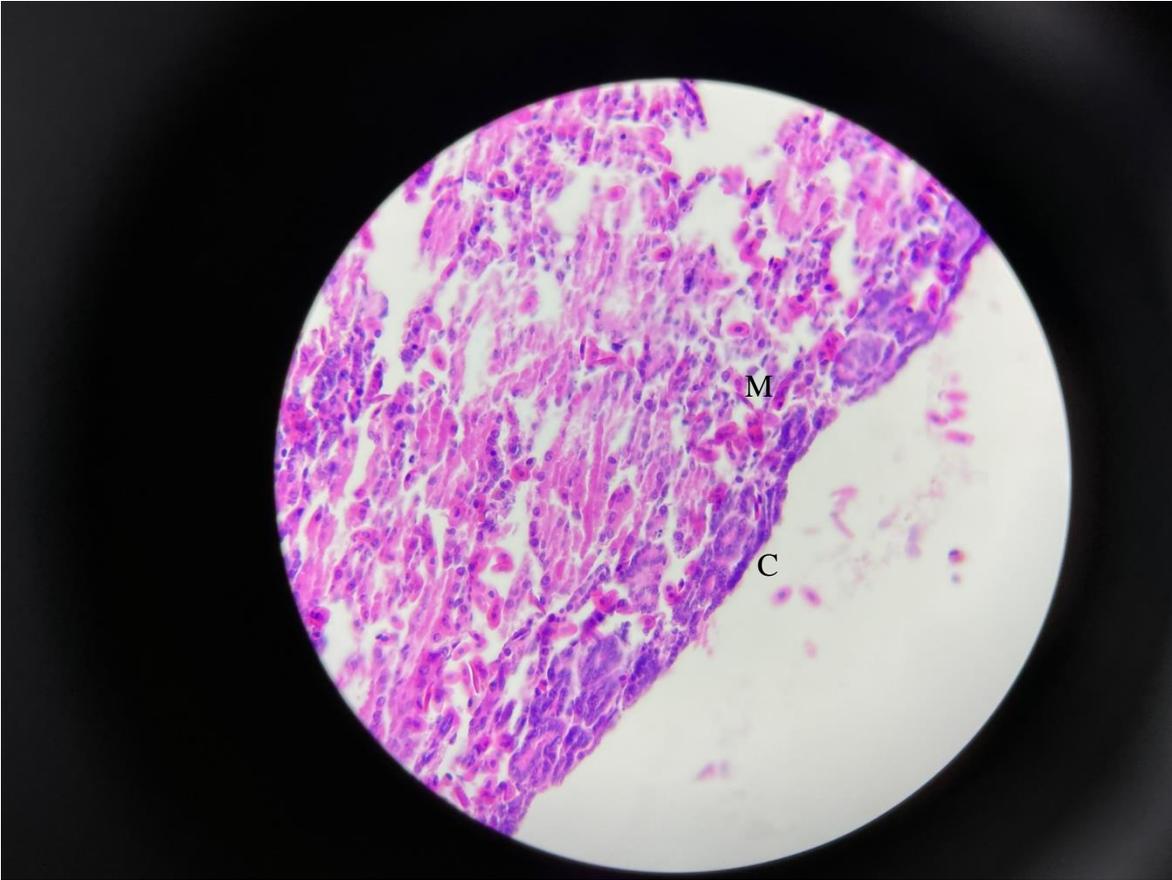


Figura 26. Ovario de individuo #15 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

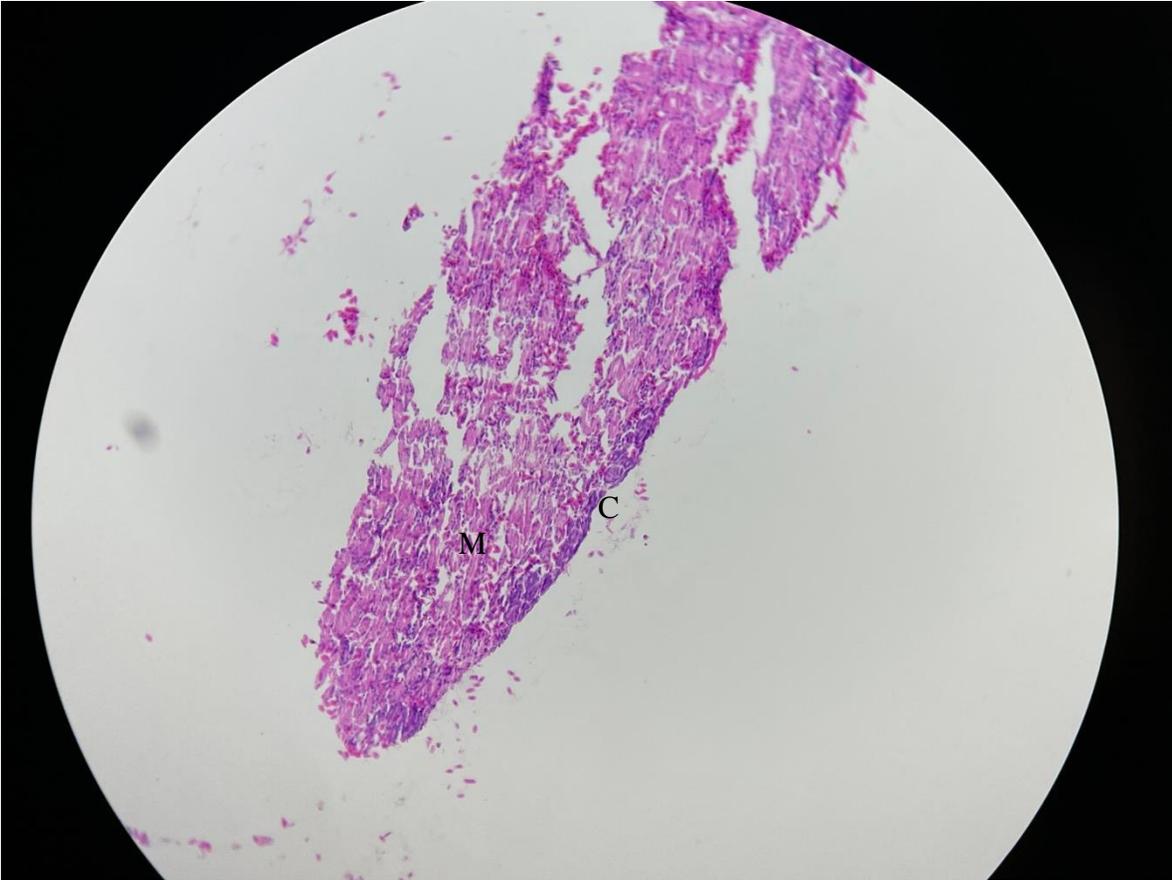


Figura 27. Ovario de individuo #20 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

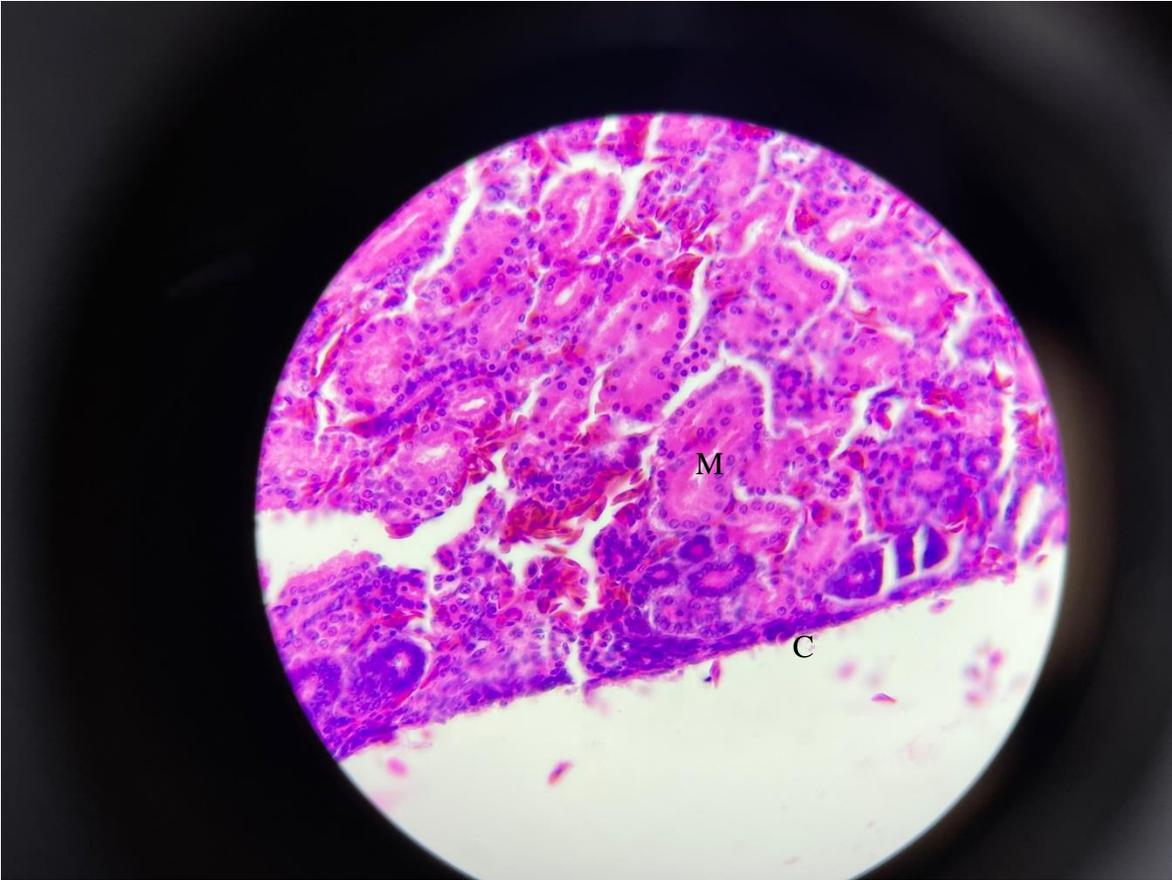


Figura 28. Testículo de individuo #1 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza poco desarrollada (C) y una médula organizada (M). 40X



Figura 29. Ovario de individuo #5 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

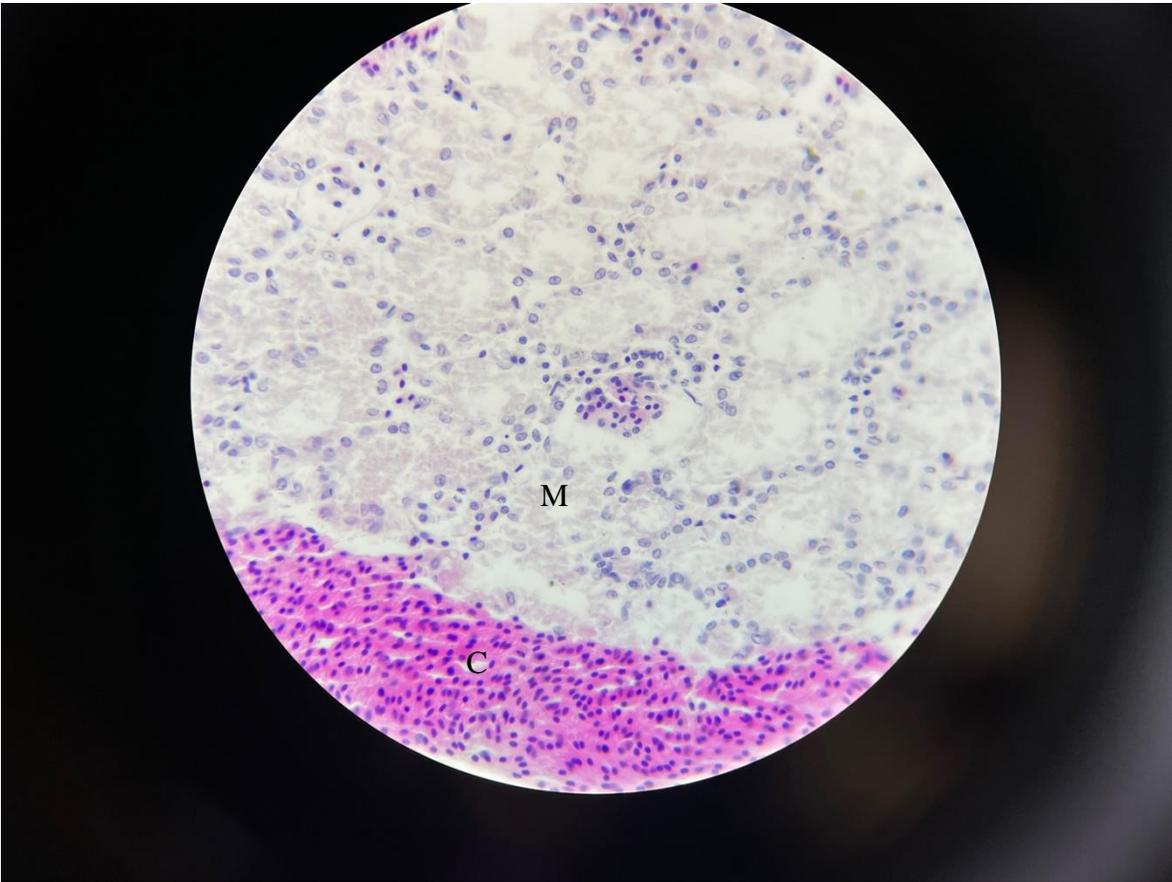


Figura 30. Ovario de individuo #7 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

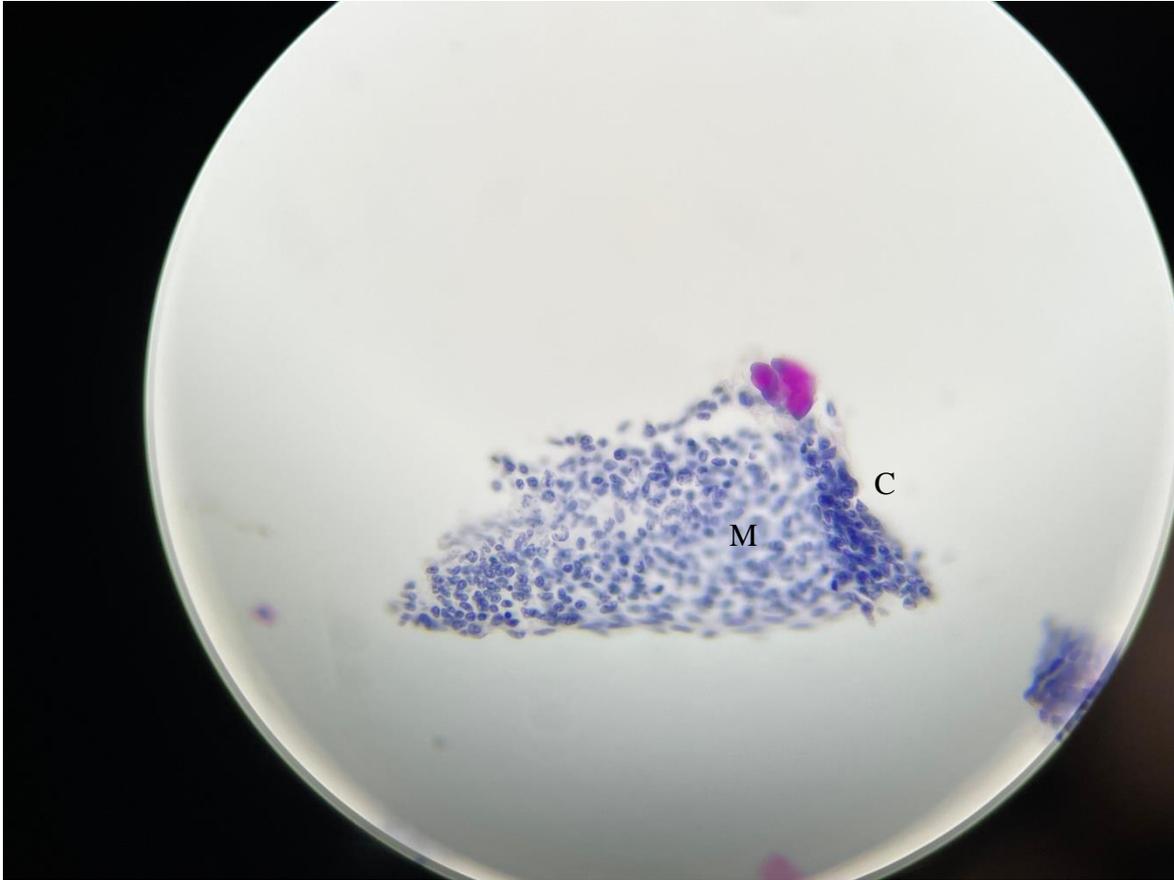


Figura 31. Ovario de individuo #8 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

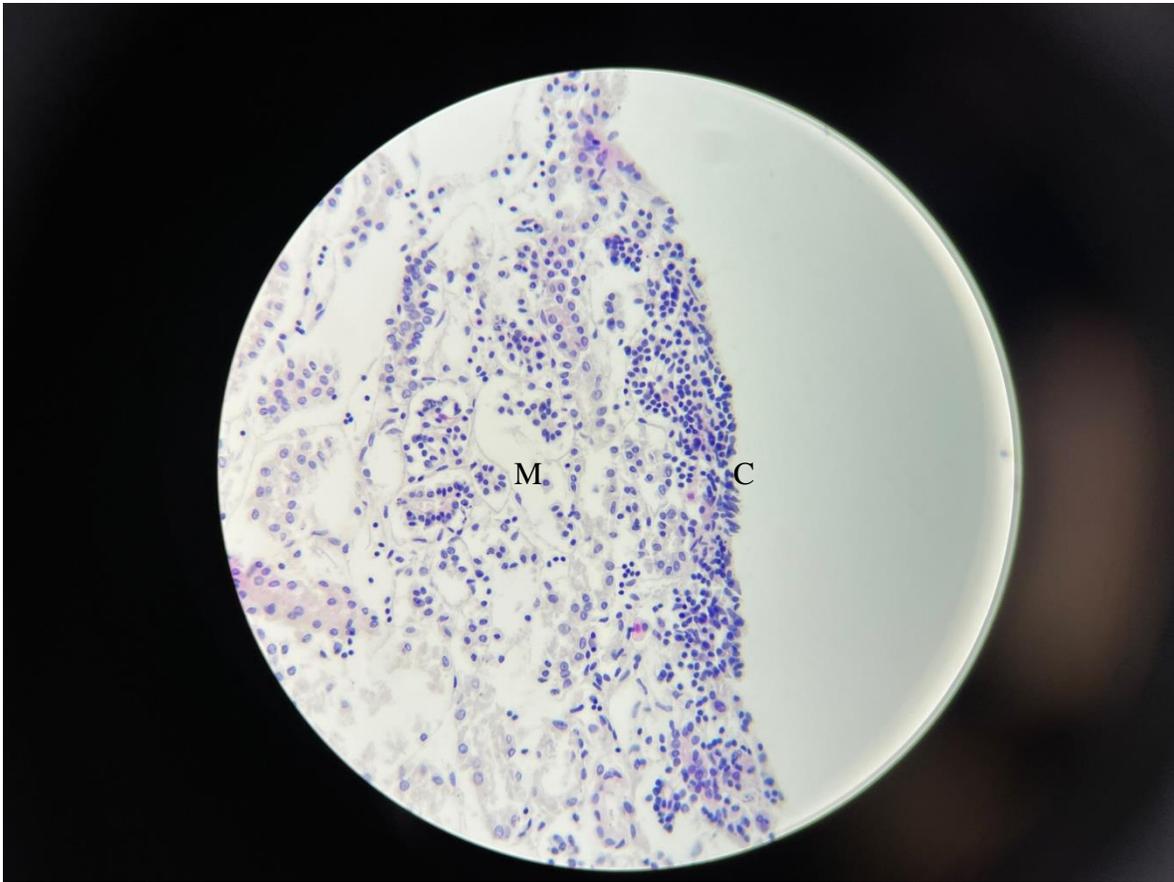


Figura 32. Ovario de individuo #9 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

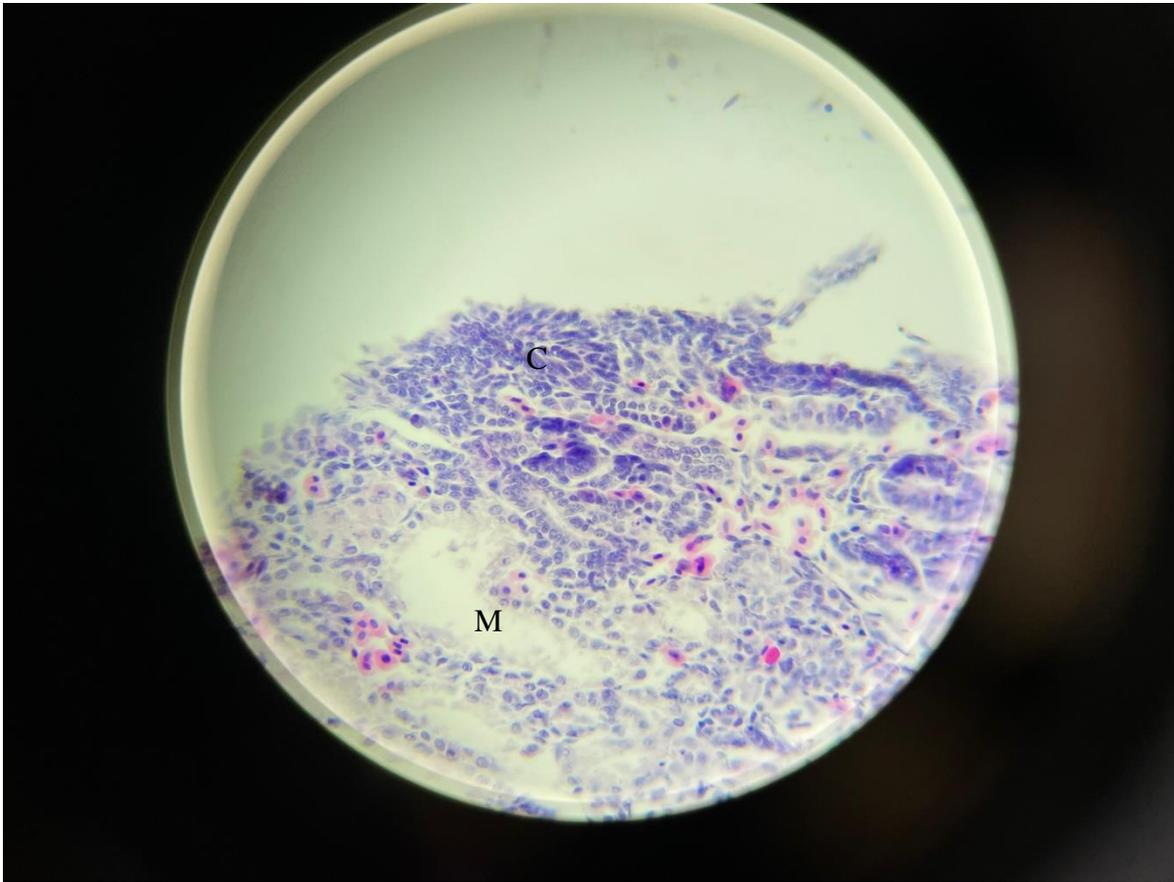


Figura 33. Ovario de individuo #11 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

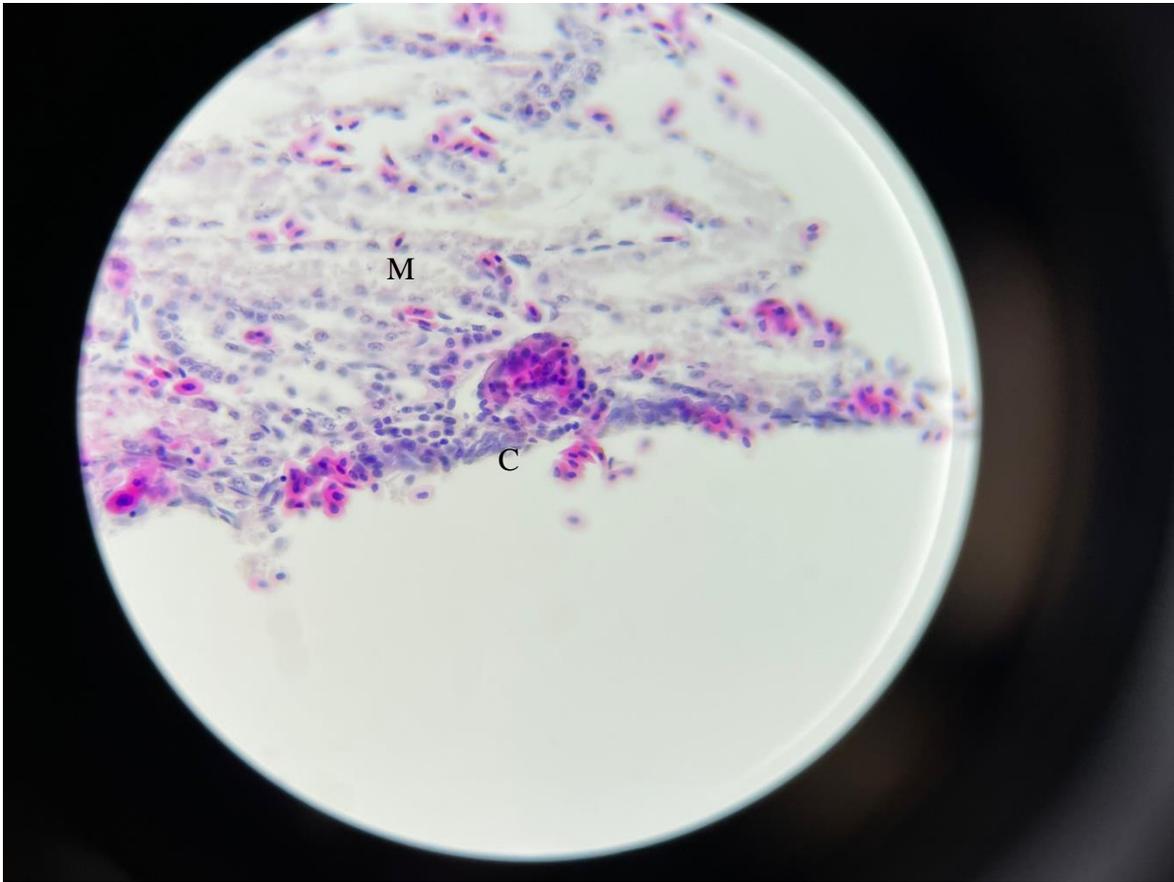


Figura 34. Ovario de individuo #13 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

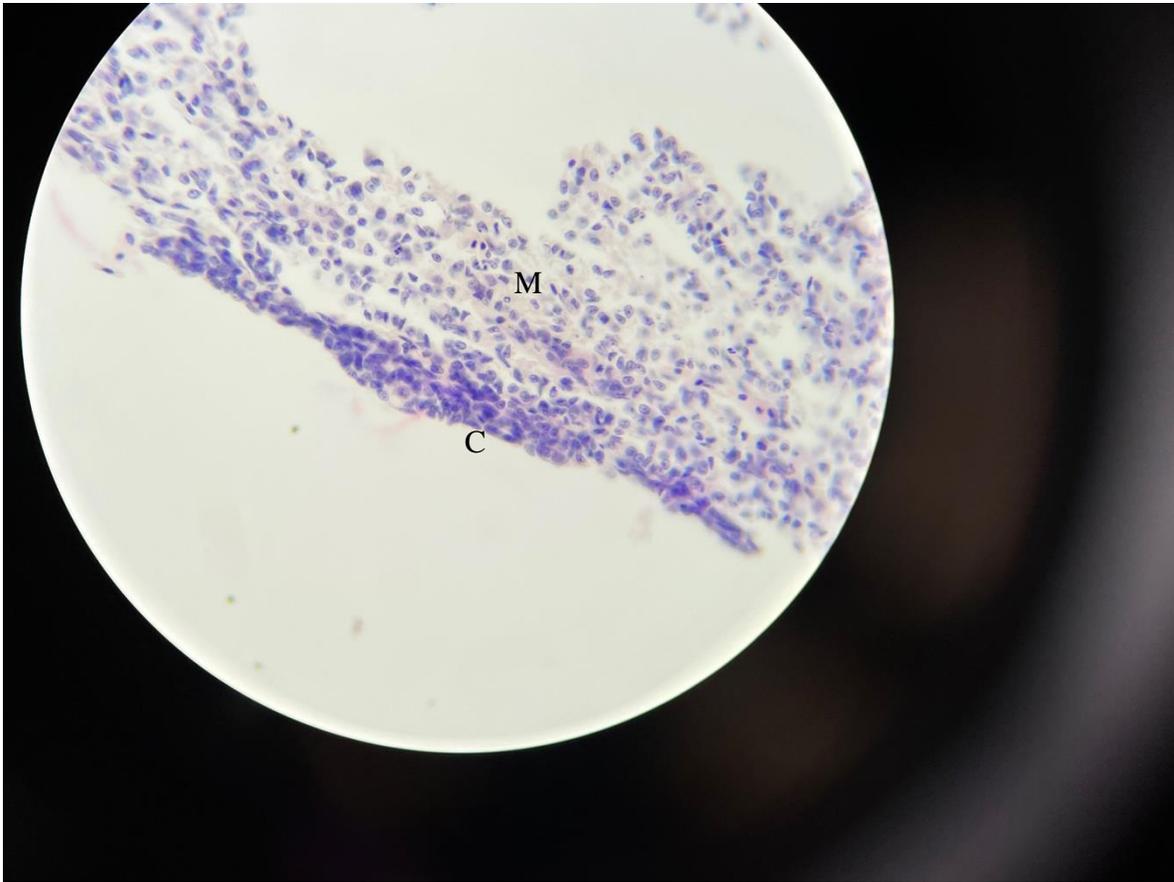


Figura 35. Ovario de individuo #16 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

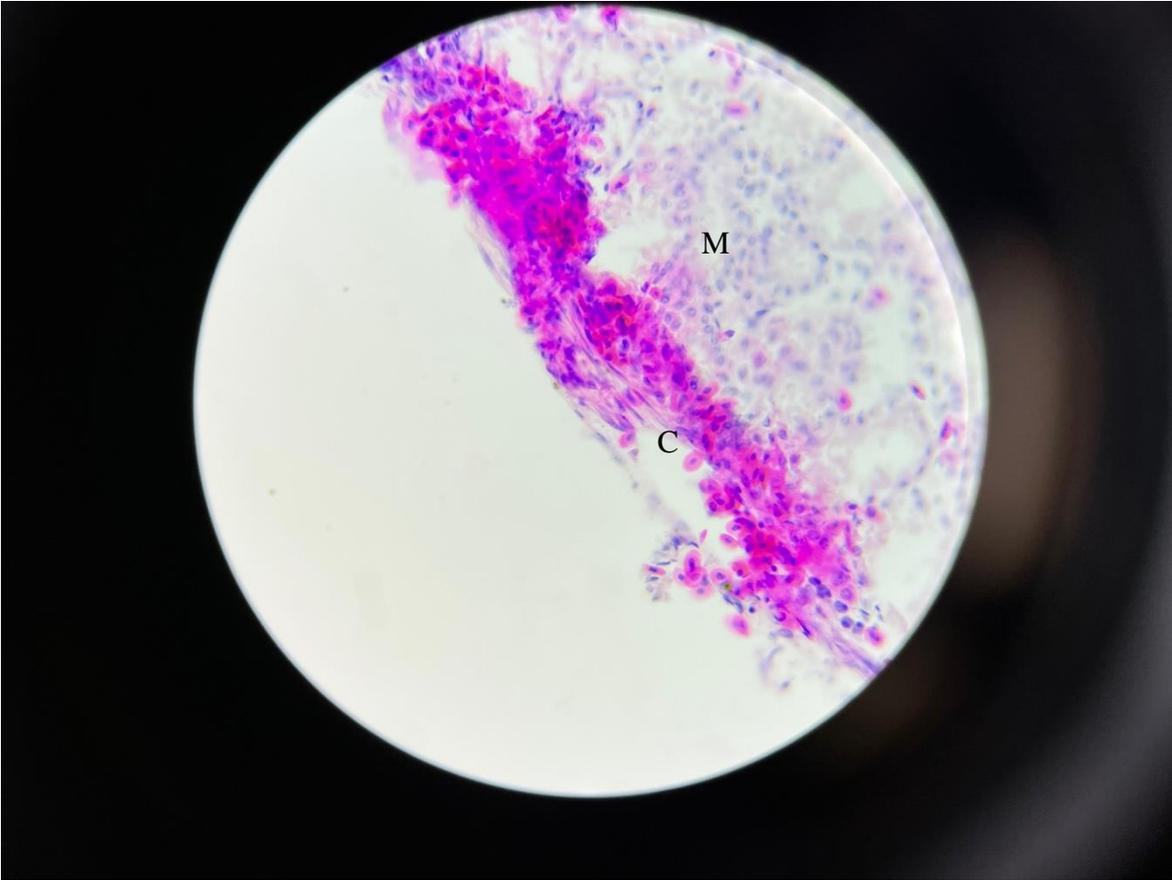


Figura 36. Ovario de individuo #17 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

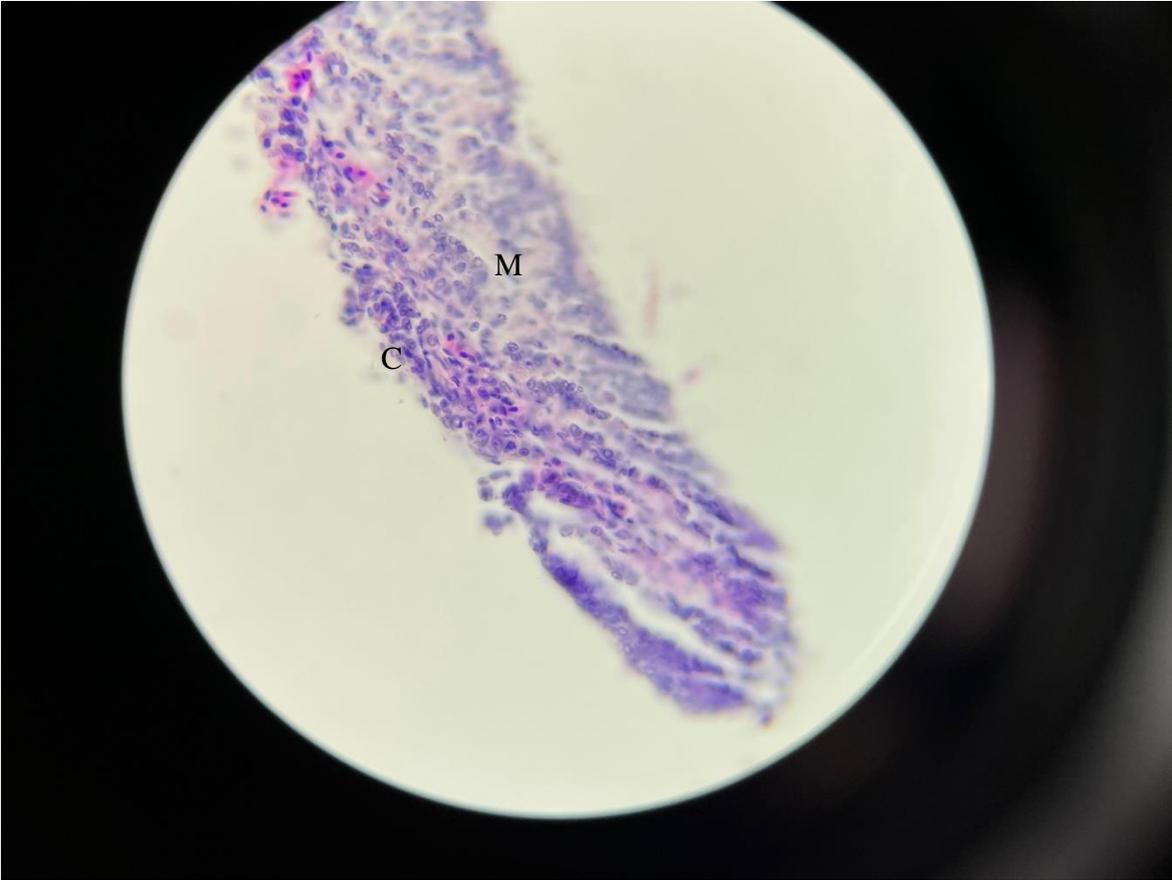


Figura 37. Ovario de individuo #18 del nido 1818 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

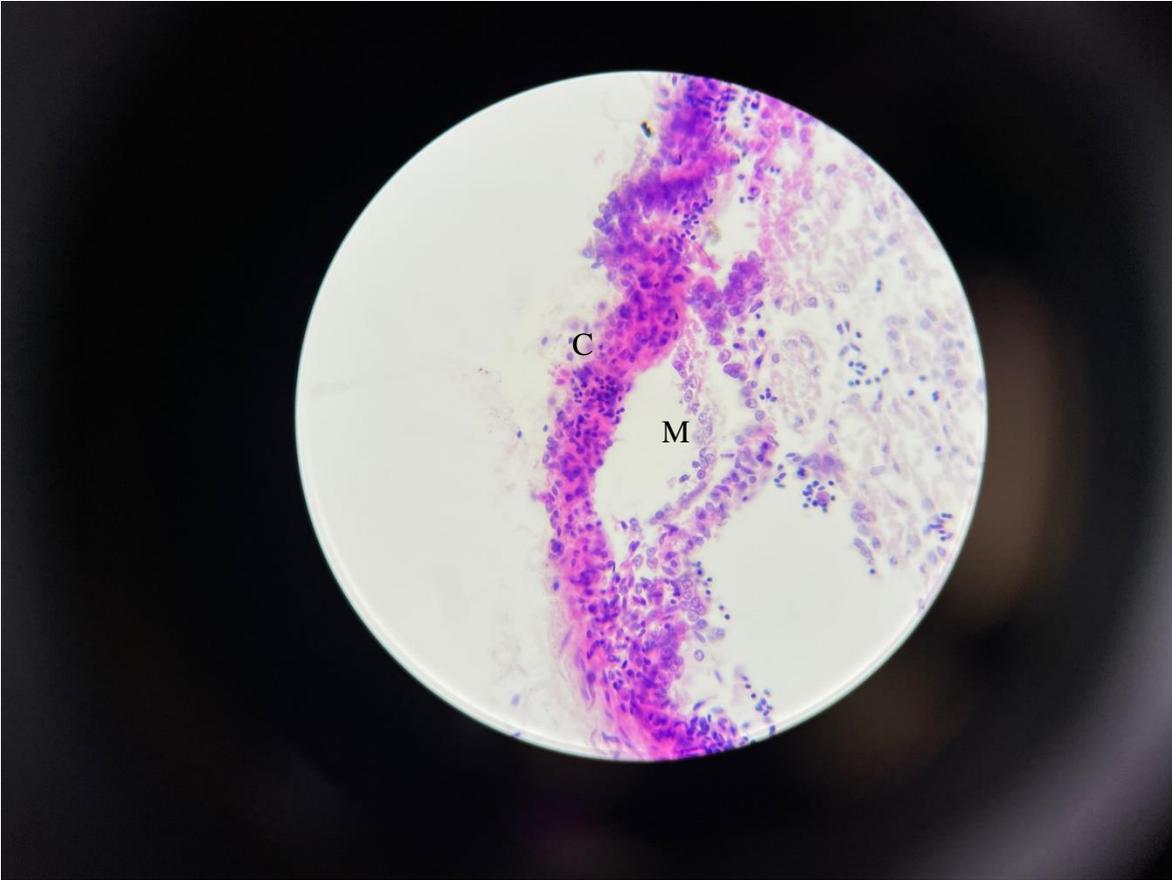


Figura 38. Ovario de individuo #21 del nido 1818 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X



Figura 39. Ovario de individuo #22 del nido 1818 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

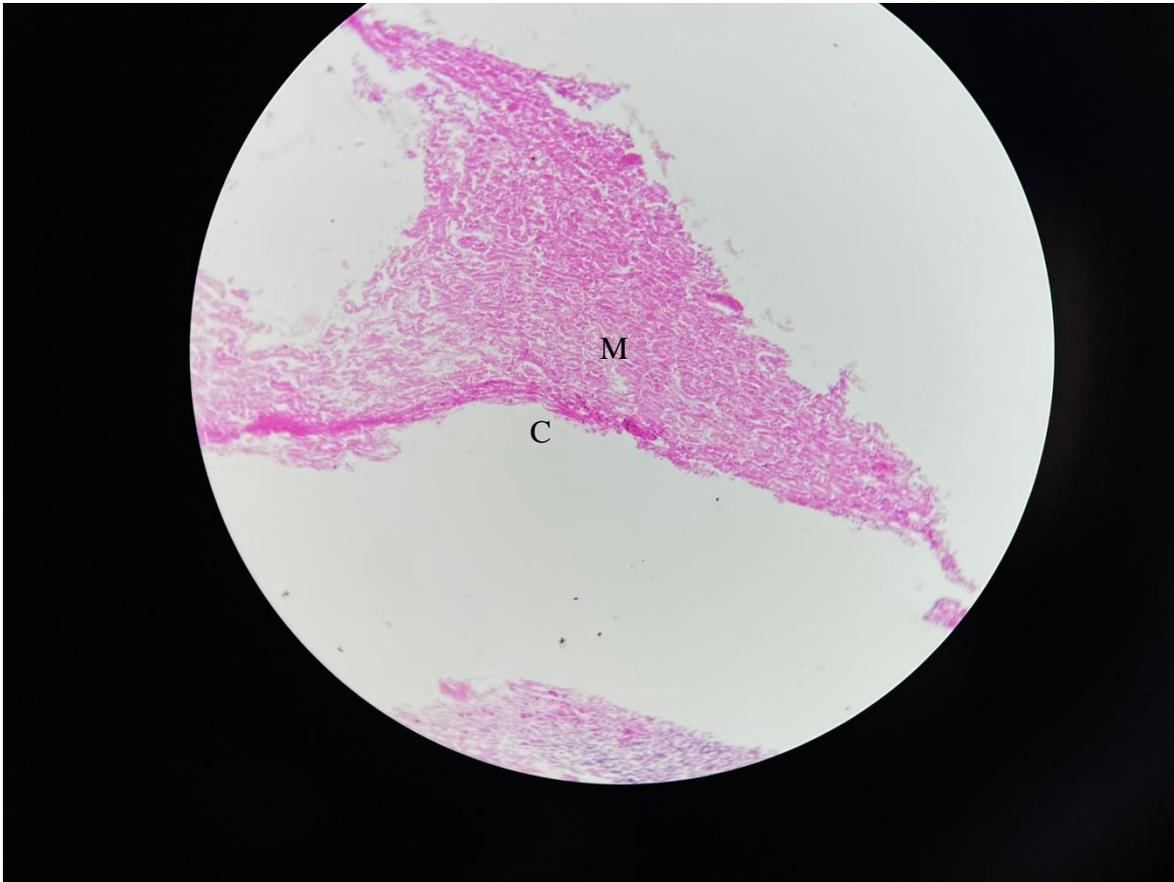


Figura 40. Ovario de individuo #25 del nido 1818 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

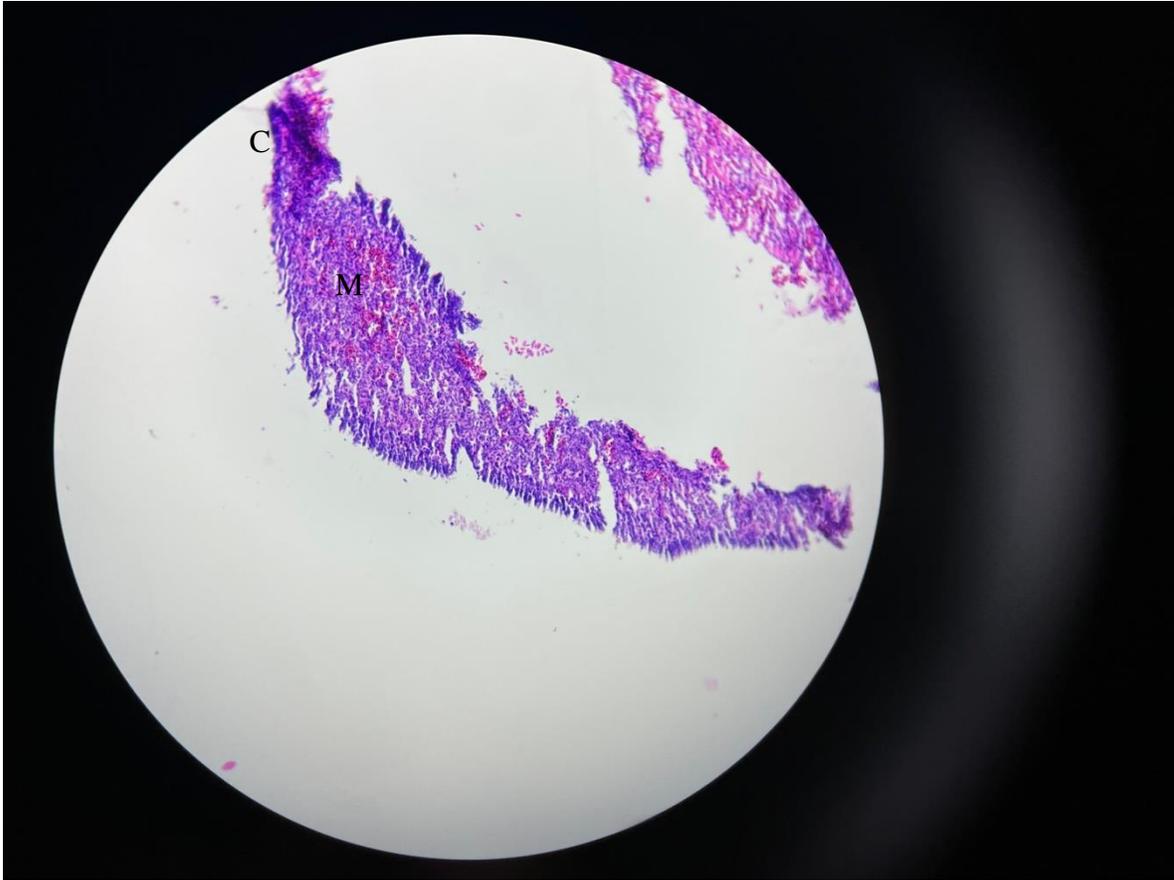


Figura 41. Ovario de individuo #2 del nido 1818 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

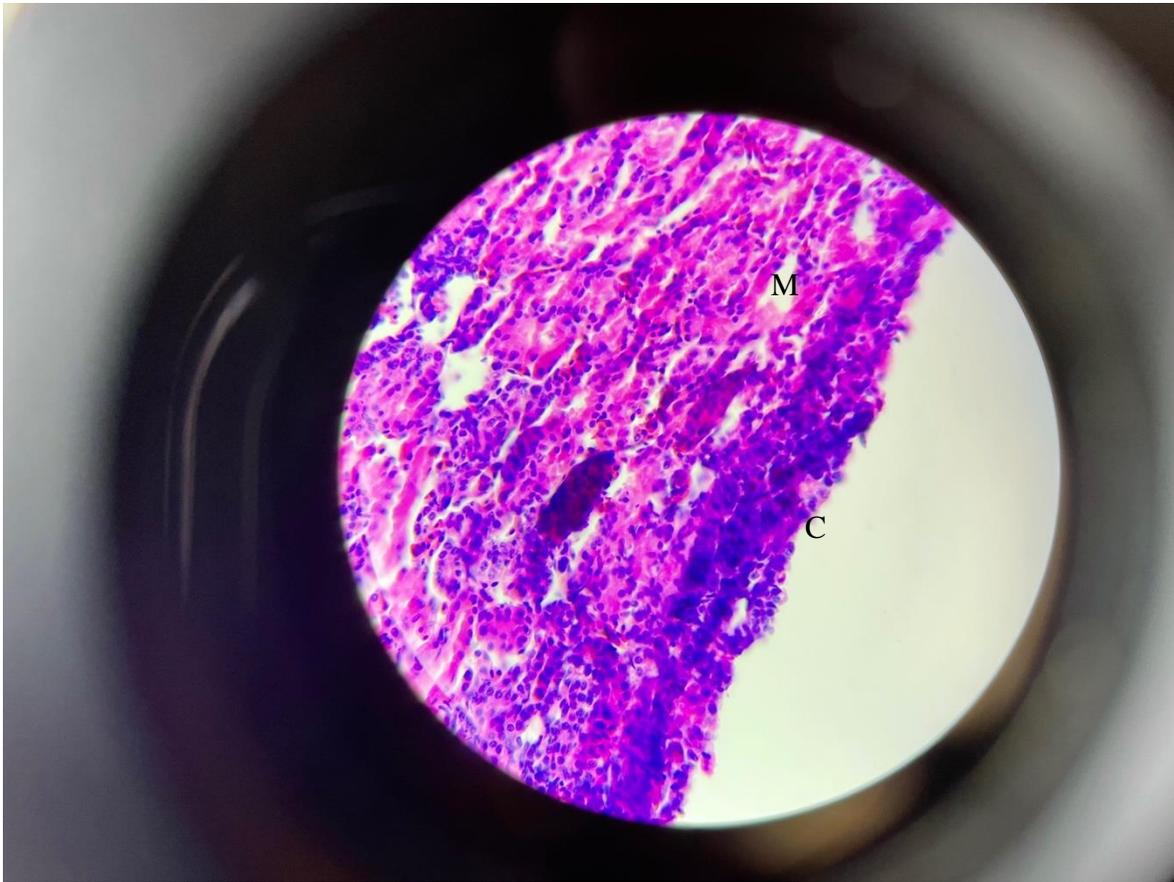


Figura 42. Ovario de individuo #3 del nido 1818 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

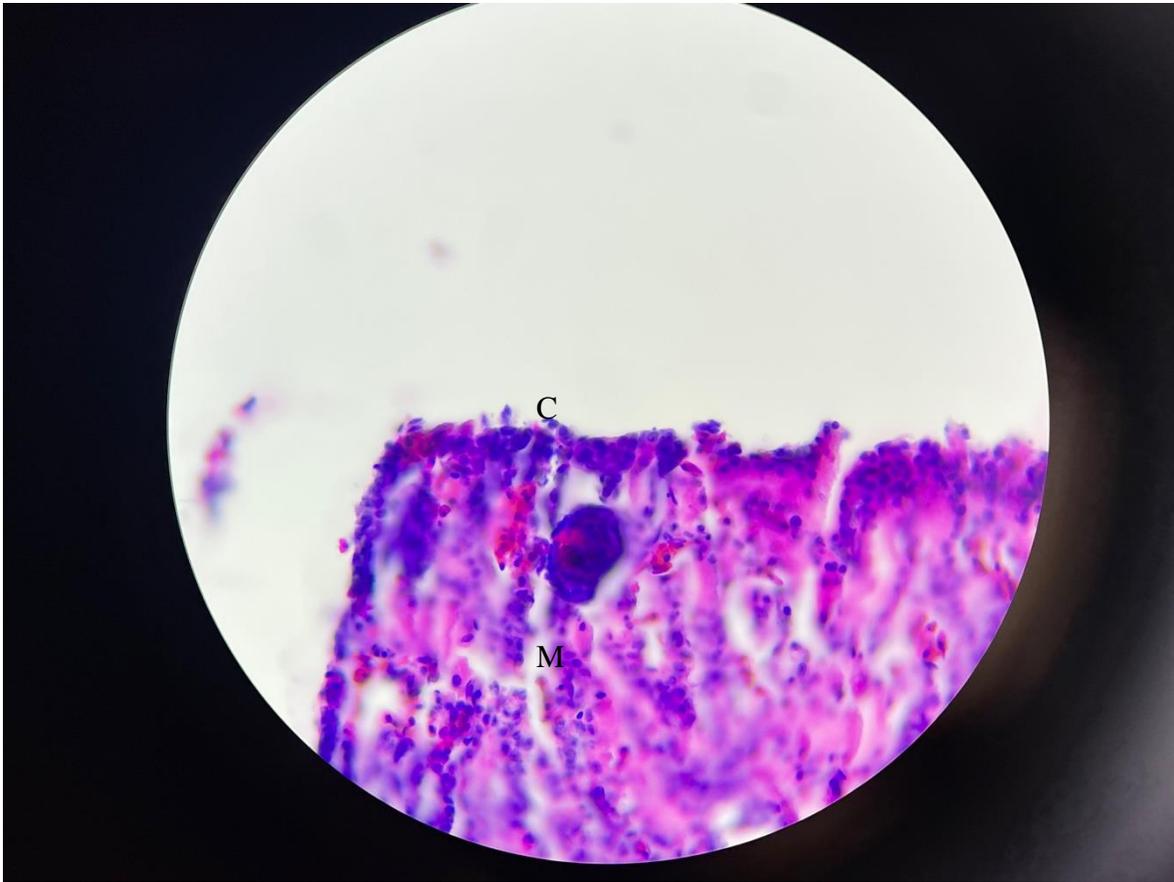


Figura 43. Ovario de individuo #M1 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

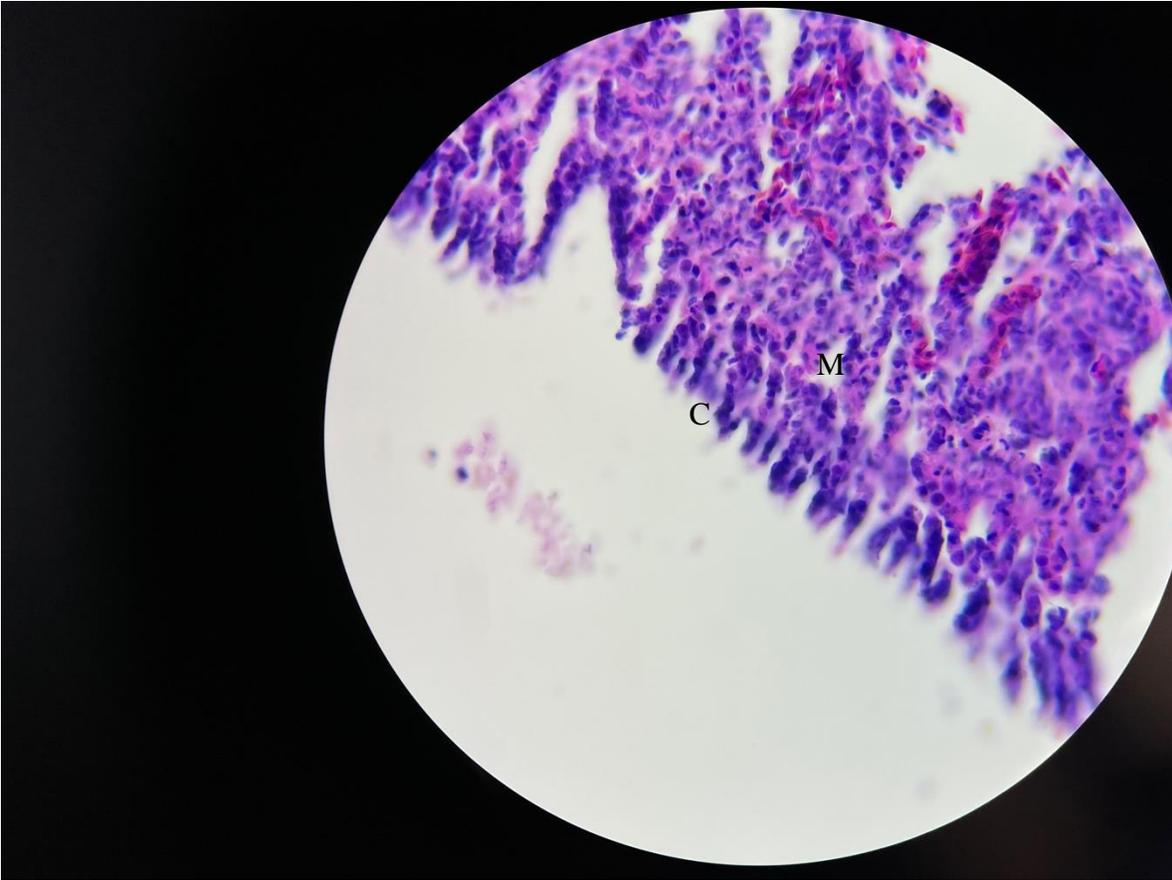


Figura 44. Ovario de individuo #M2 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

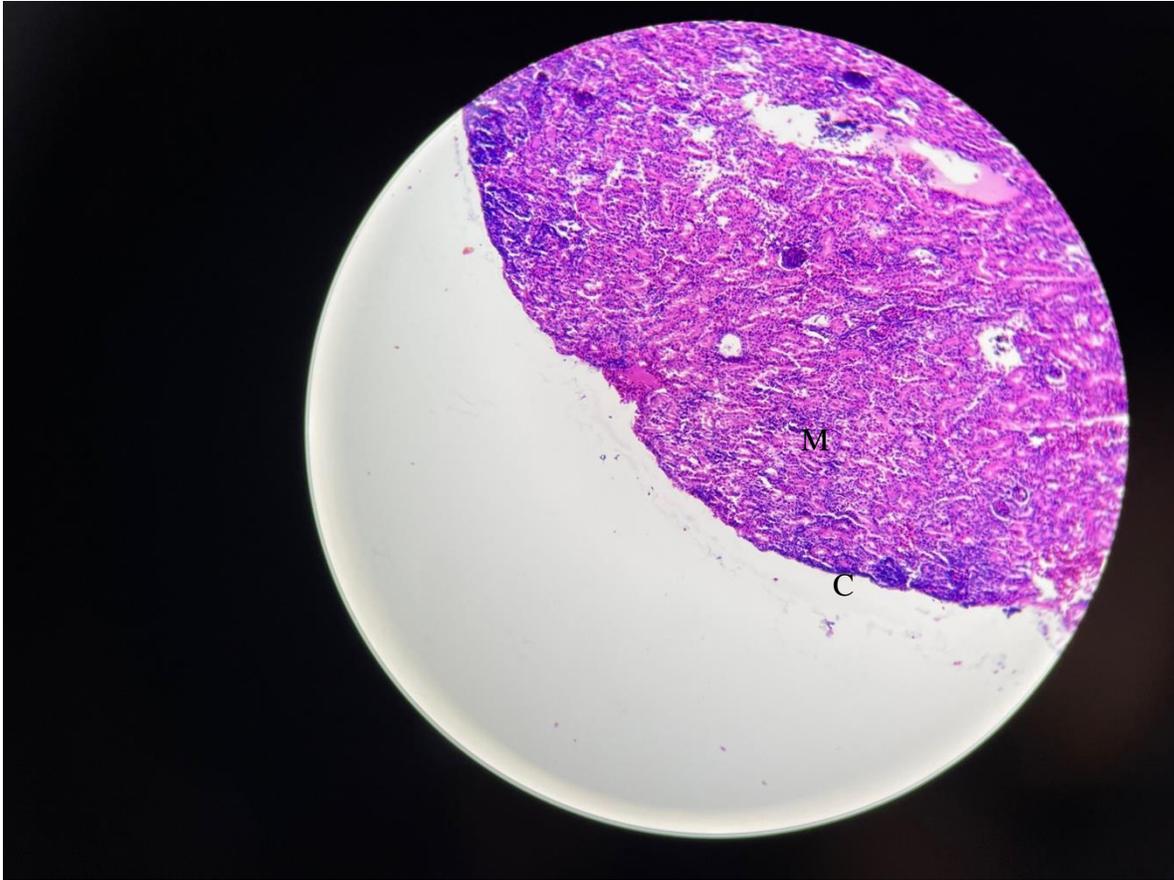


Figura 45. Ovario de individuo #M3 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

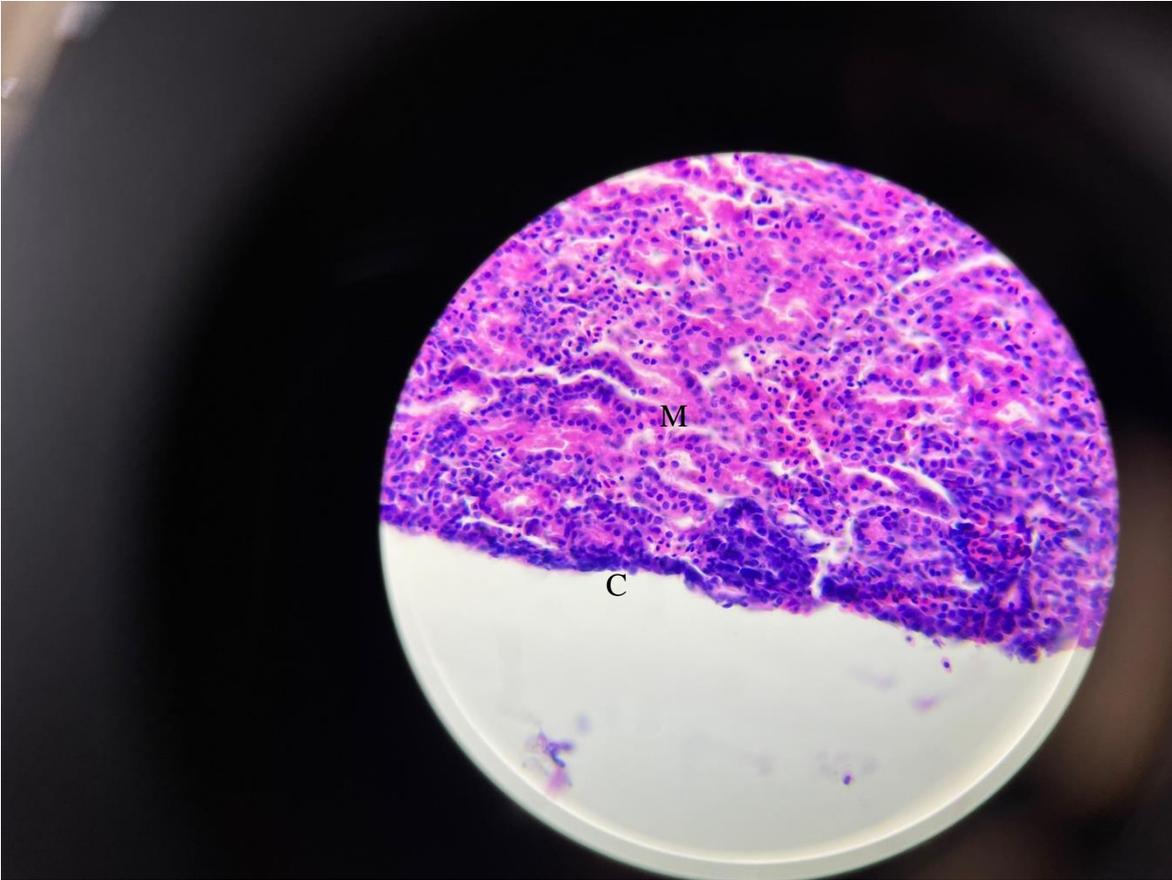


Figura 46. Ovario de individuo #M4 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

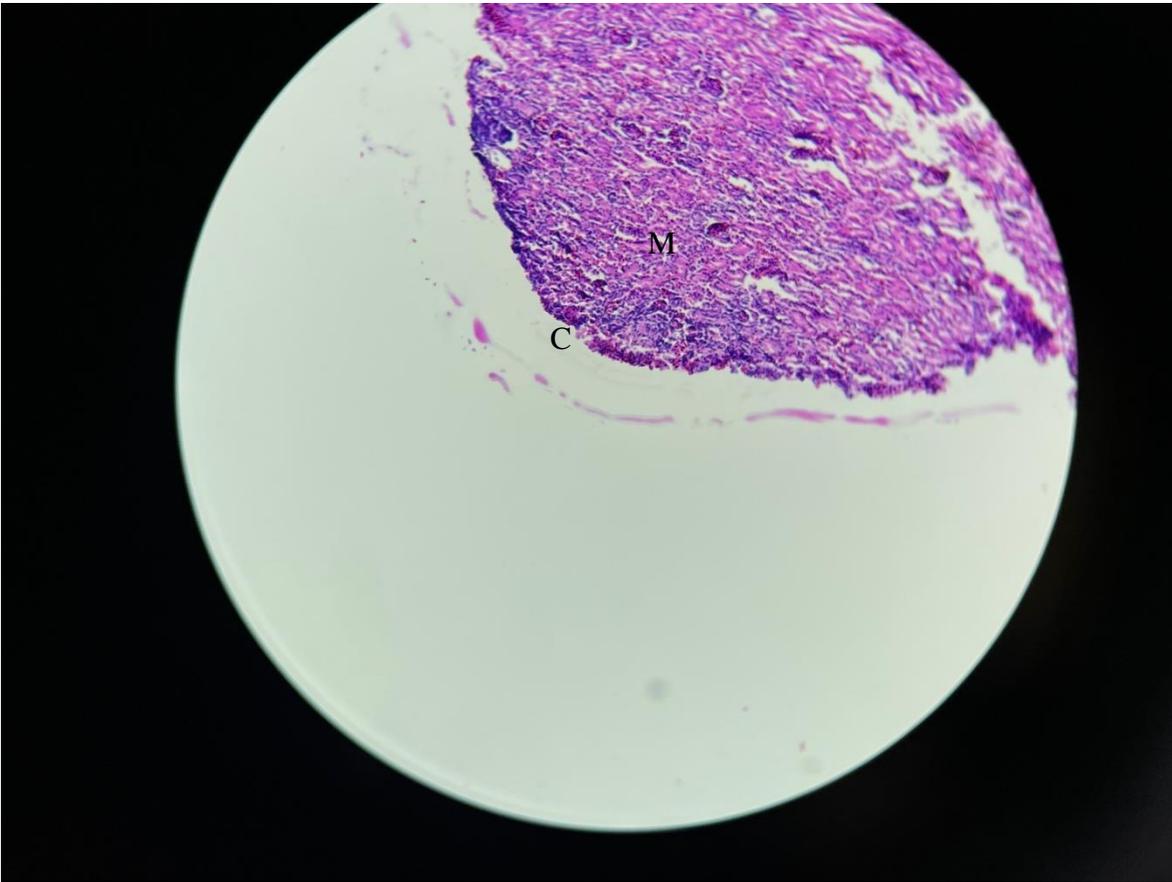


Figura 47. Ovario de individuo #M5 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

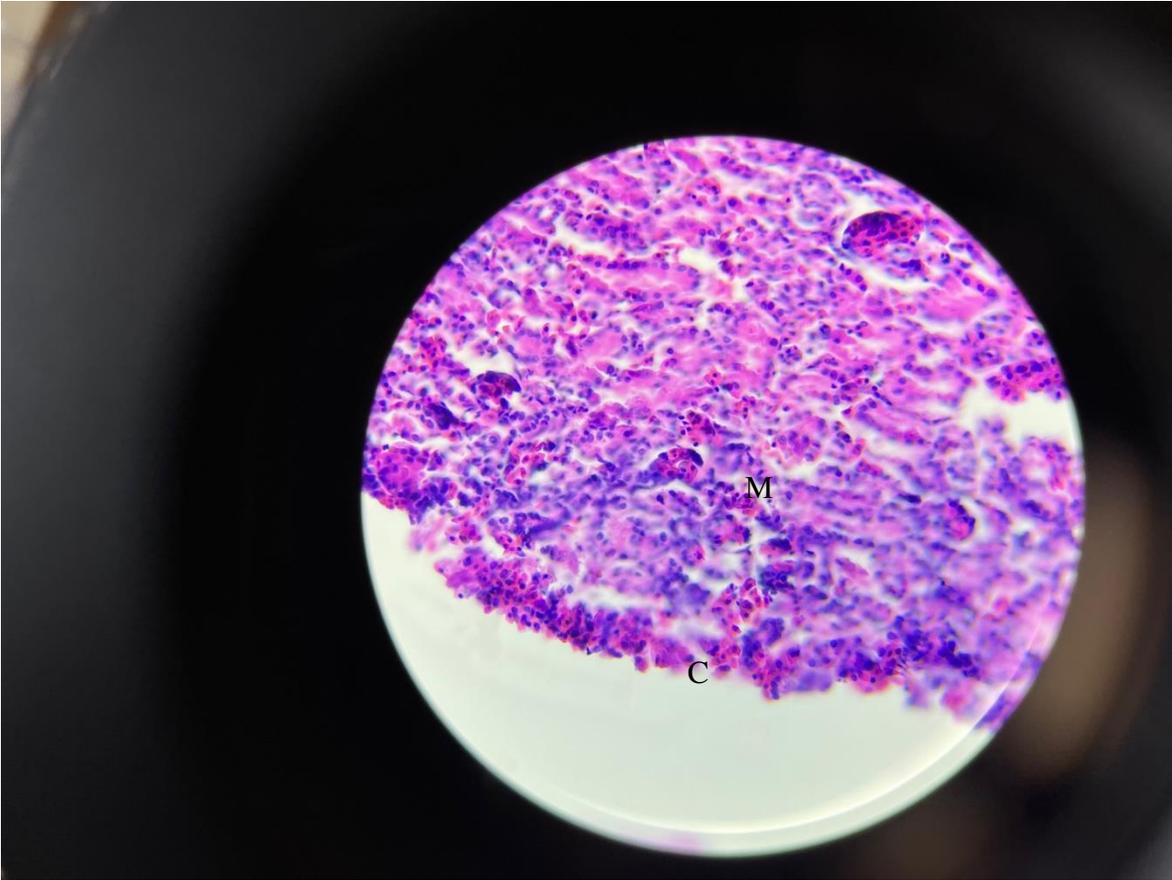


Figura 48. Ovario de individuo #M6 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

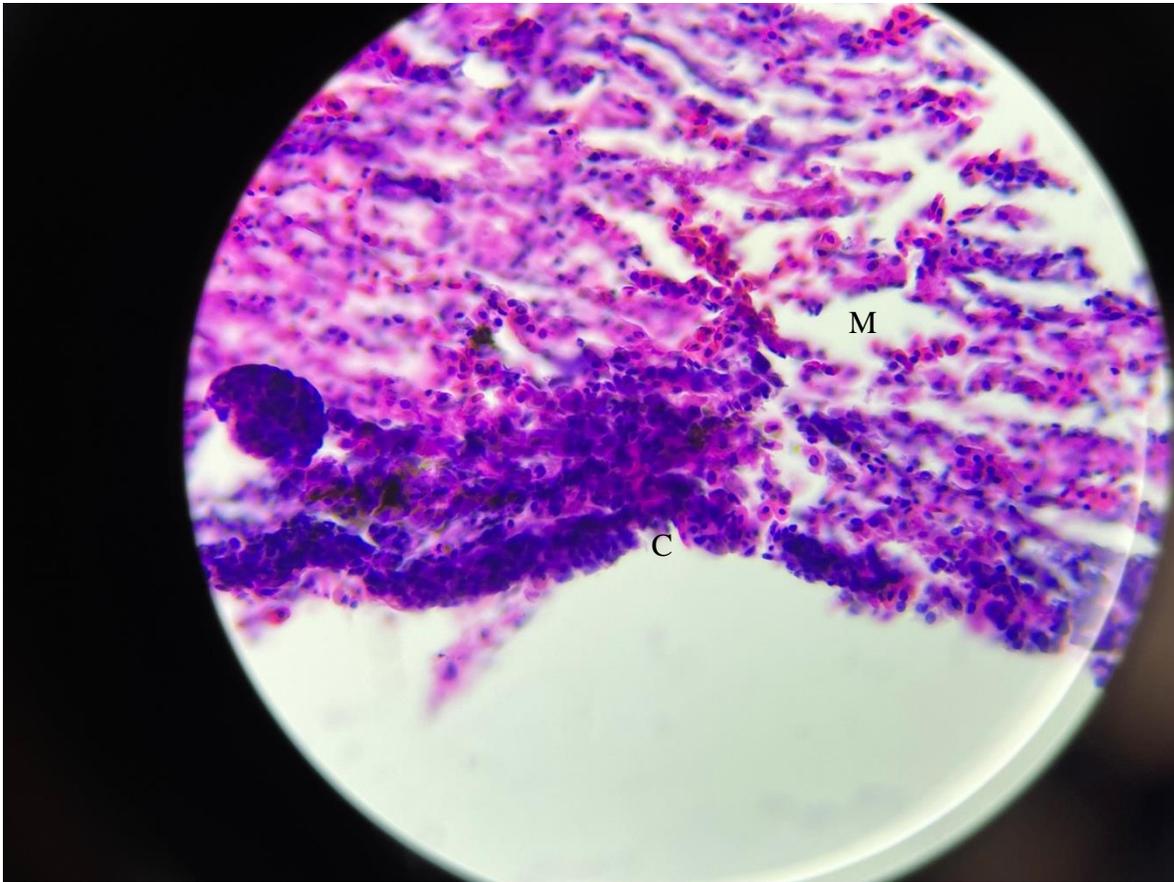


Figura 49. Ovario de individuo #M7 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

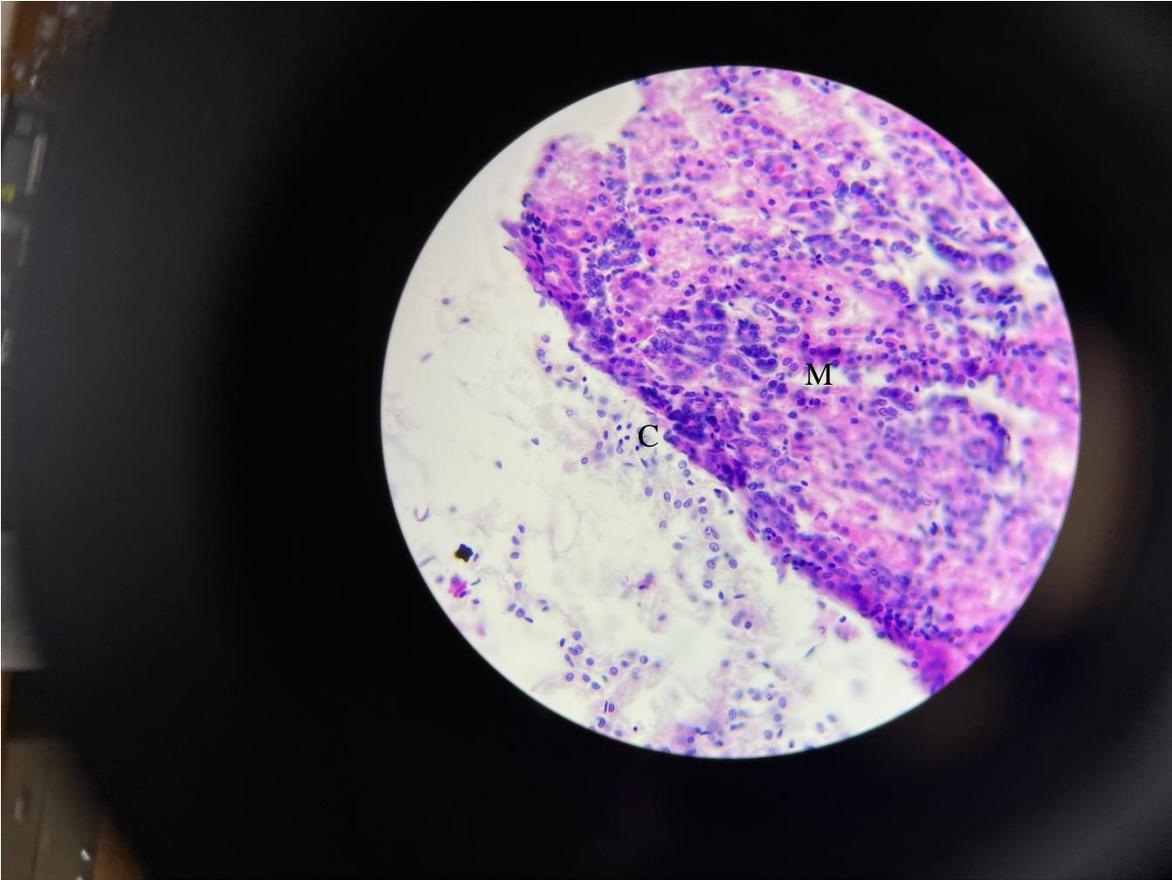


Figura 50. Ovario de individuo #M8 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

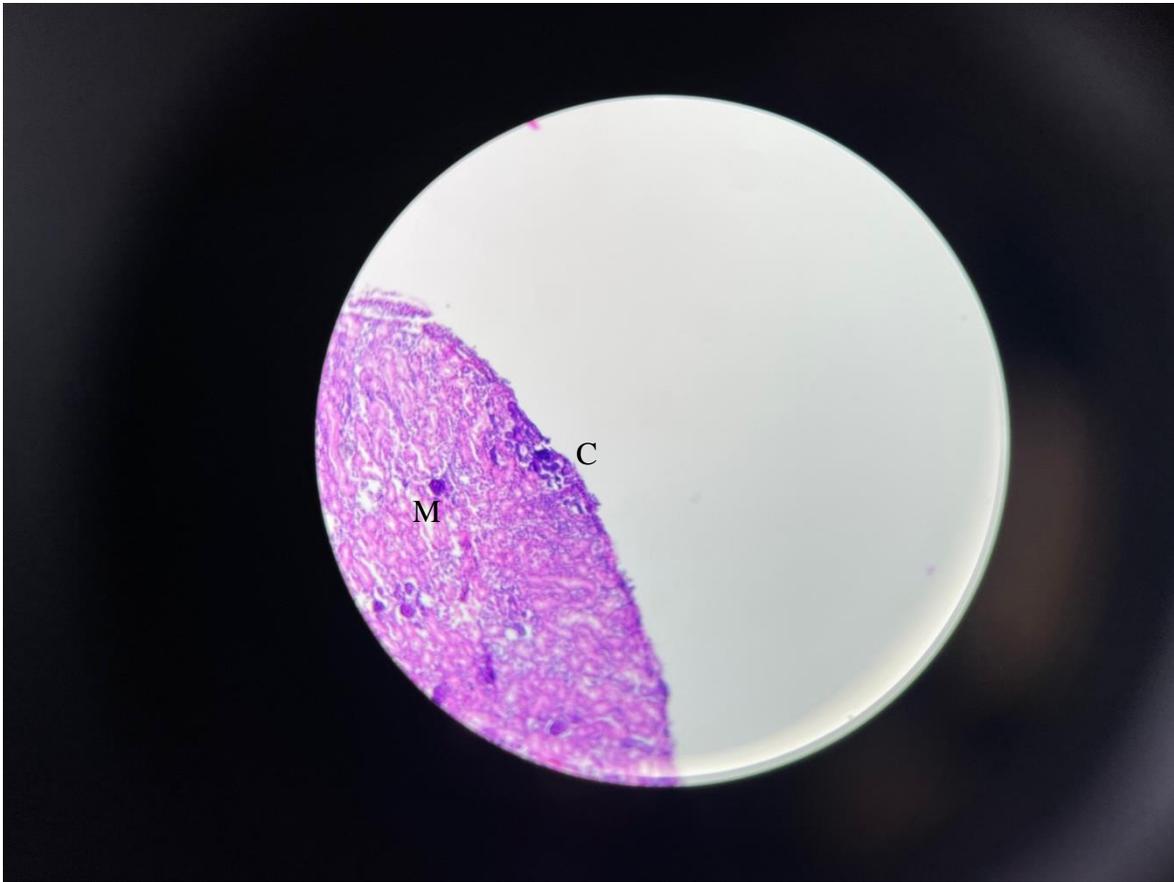


Figura 51. Ovario de individuo #M9 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X



Figura 52. Ovario de individuo #M10 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X



Figura 53. Ovario de individuo #M11 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

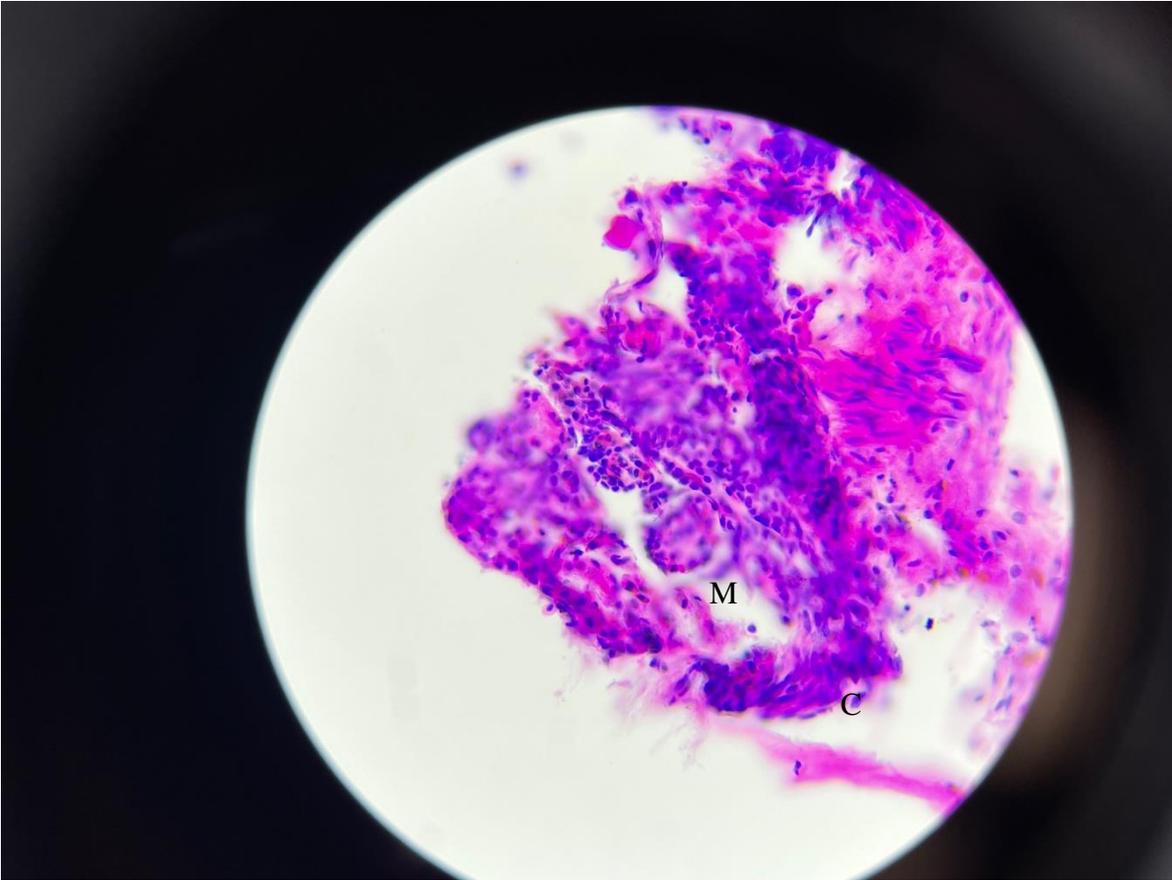


Figura 54. Ovario de individuo #M12 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

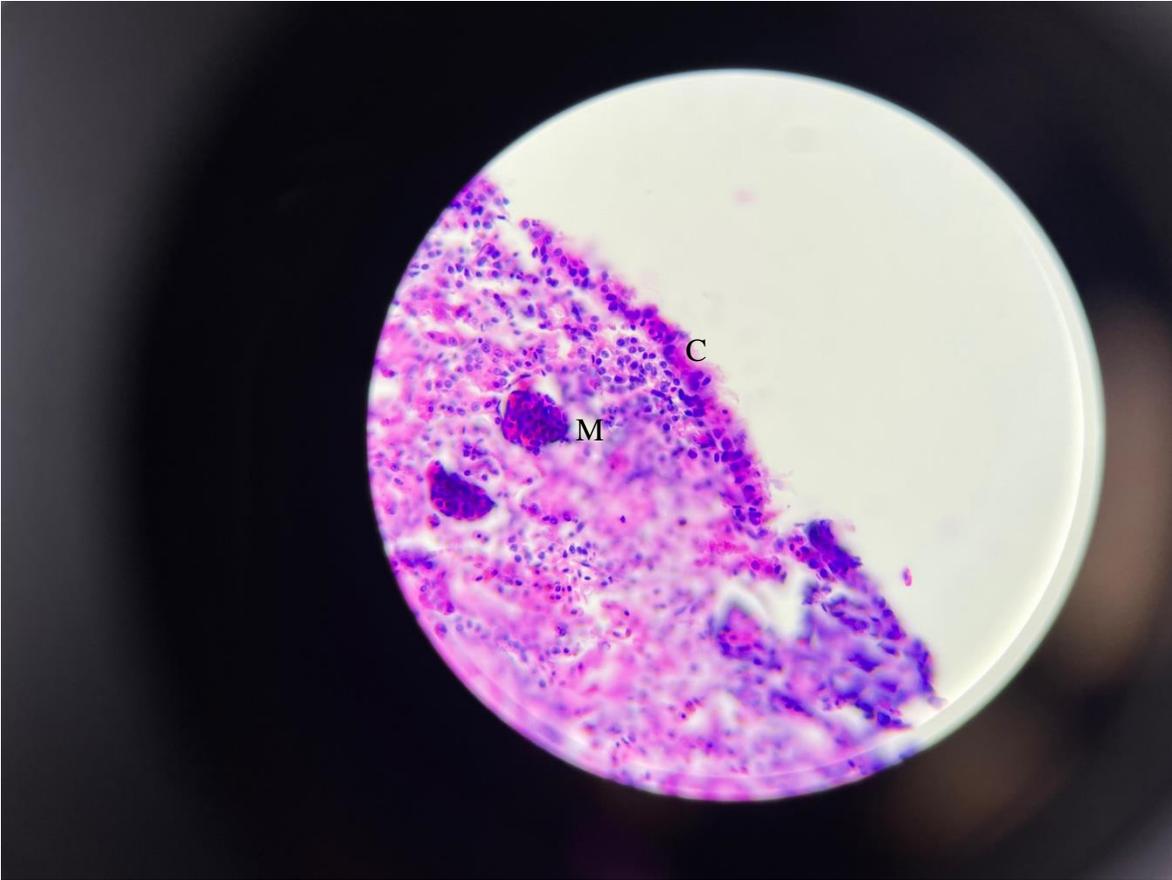


Figura 55. Ovario de individuo #M13 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

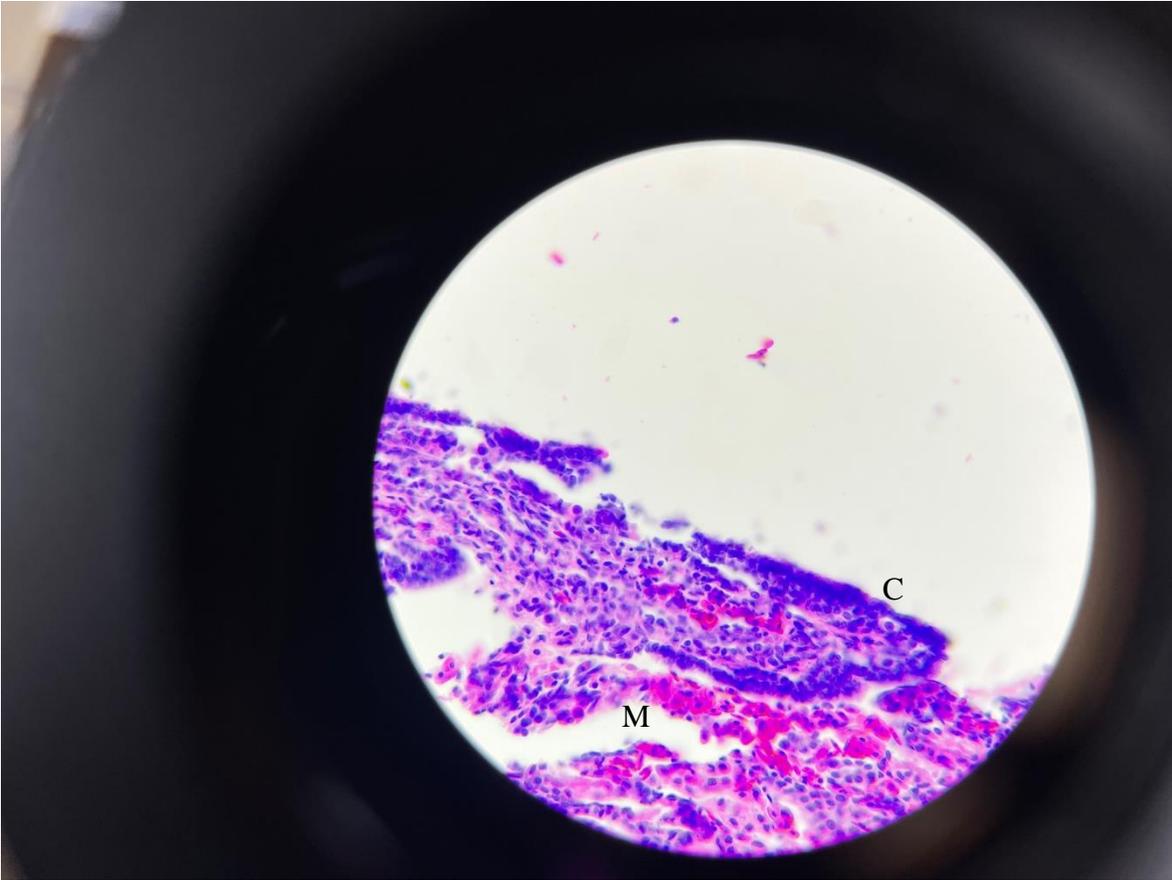


Figura 56. Ovario de individuo #M14 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

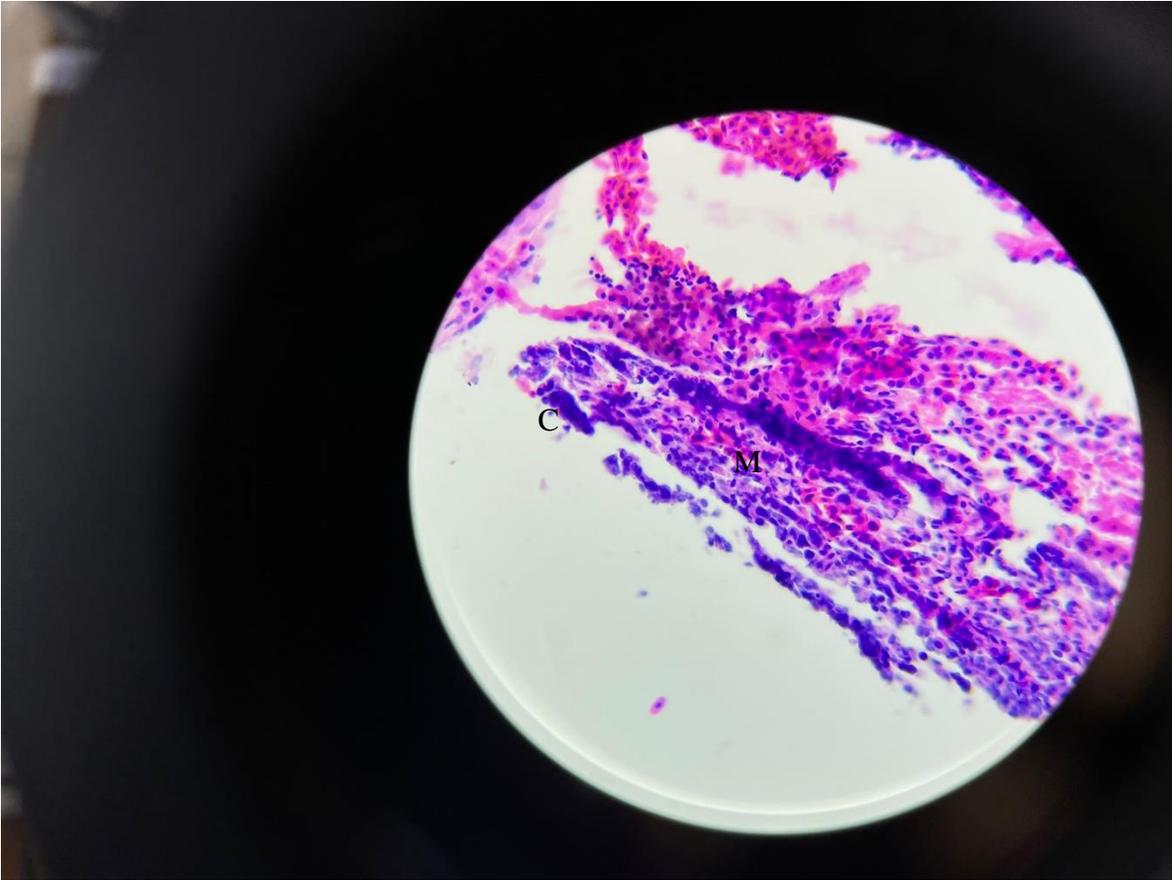


Figura 57. Ovario de individuo #M15 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X

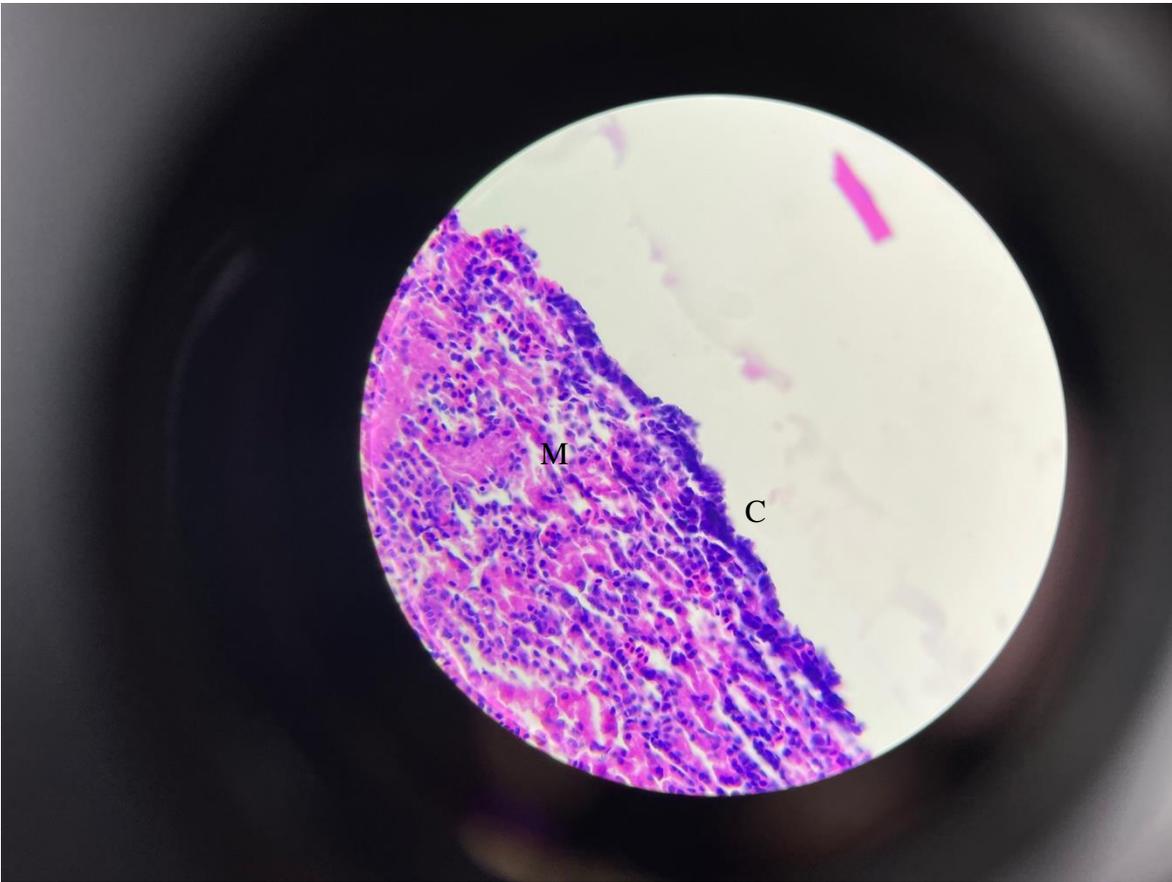


Figura 58. Ovario de individuo #M16 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

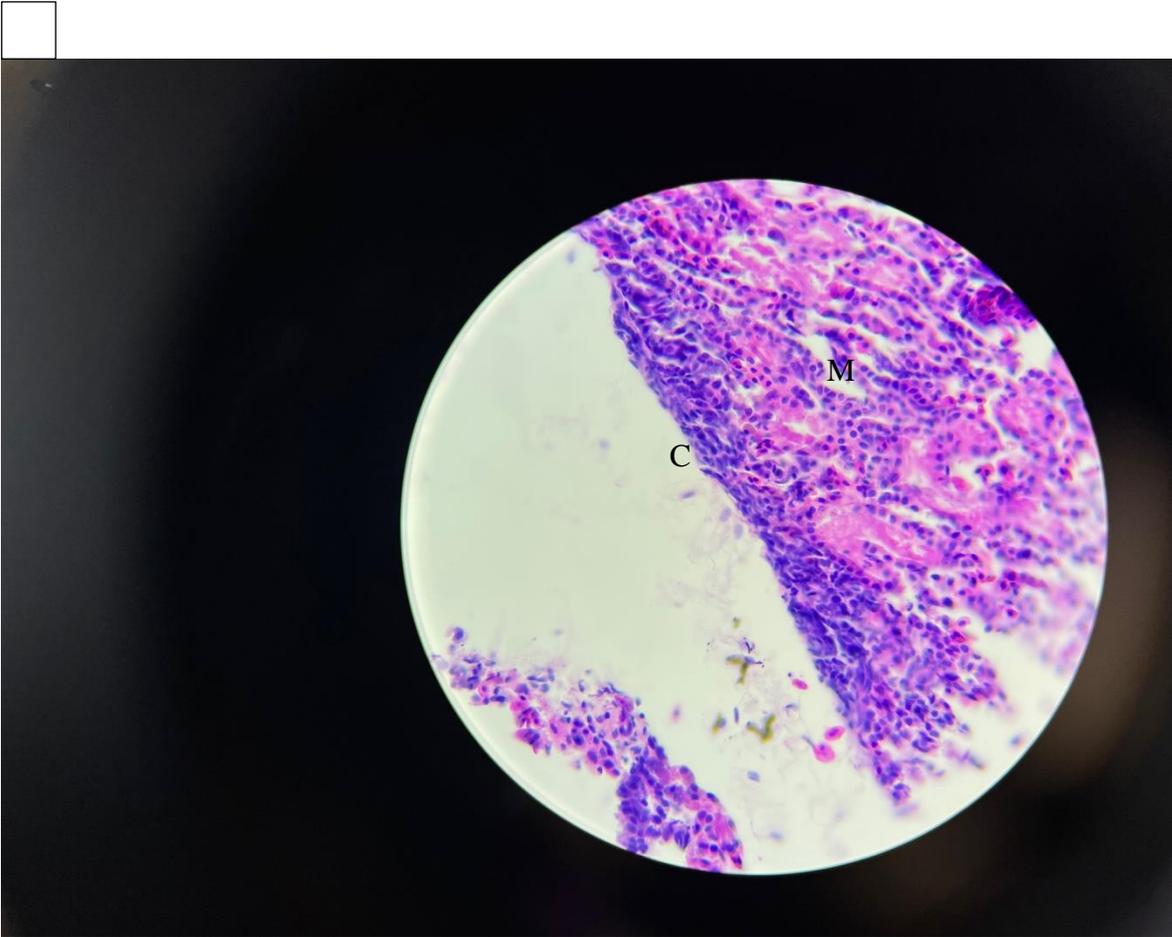


Figura 59. Ovario de individuo #M17 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

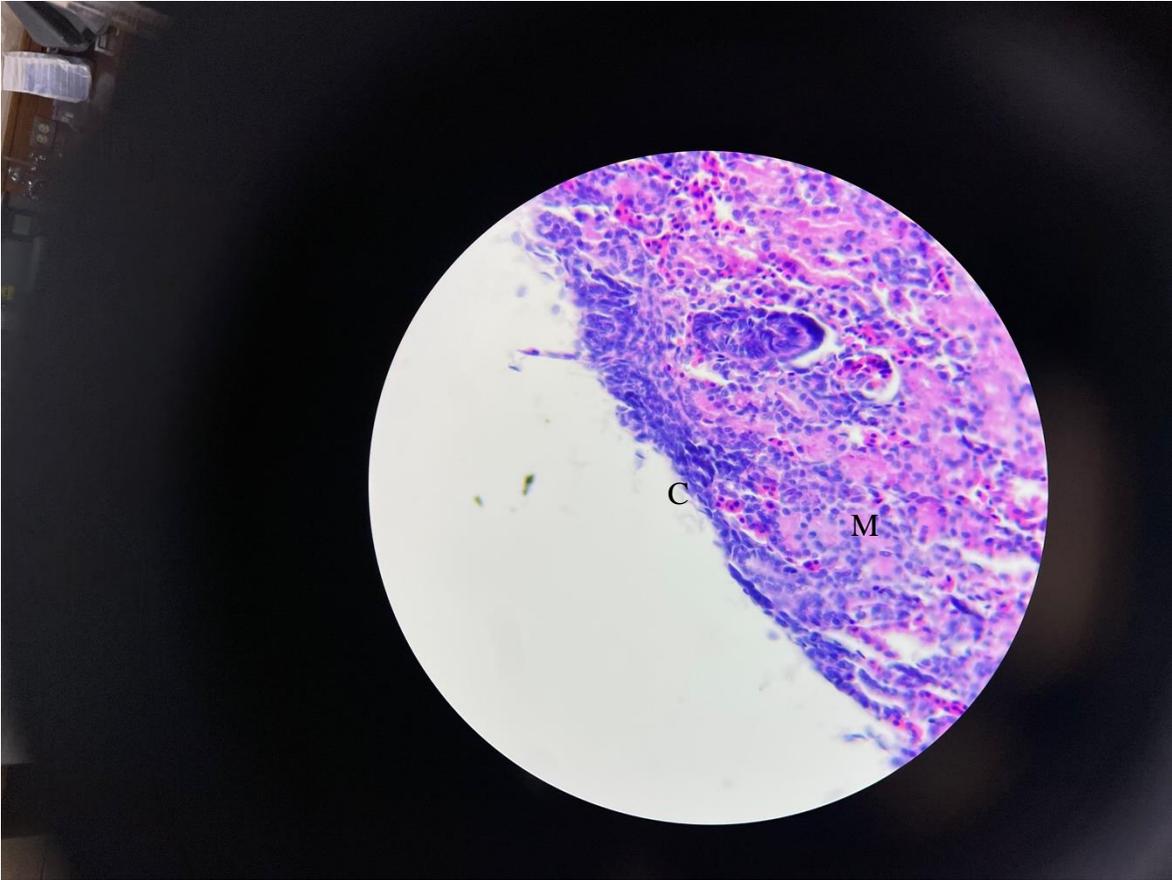


Figura 60. Ovario de individuo #M18 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

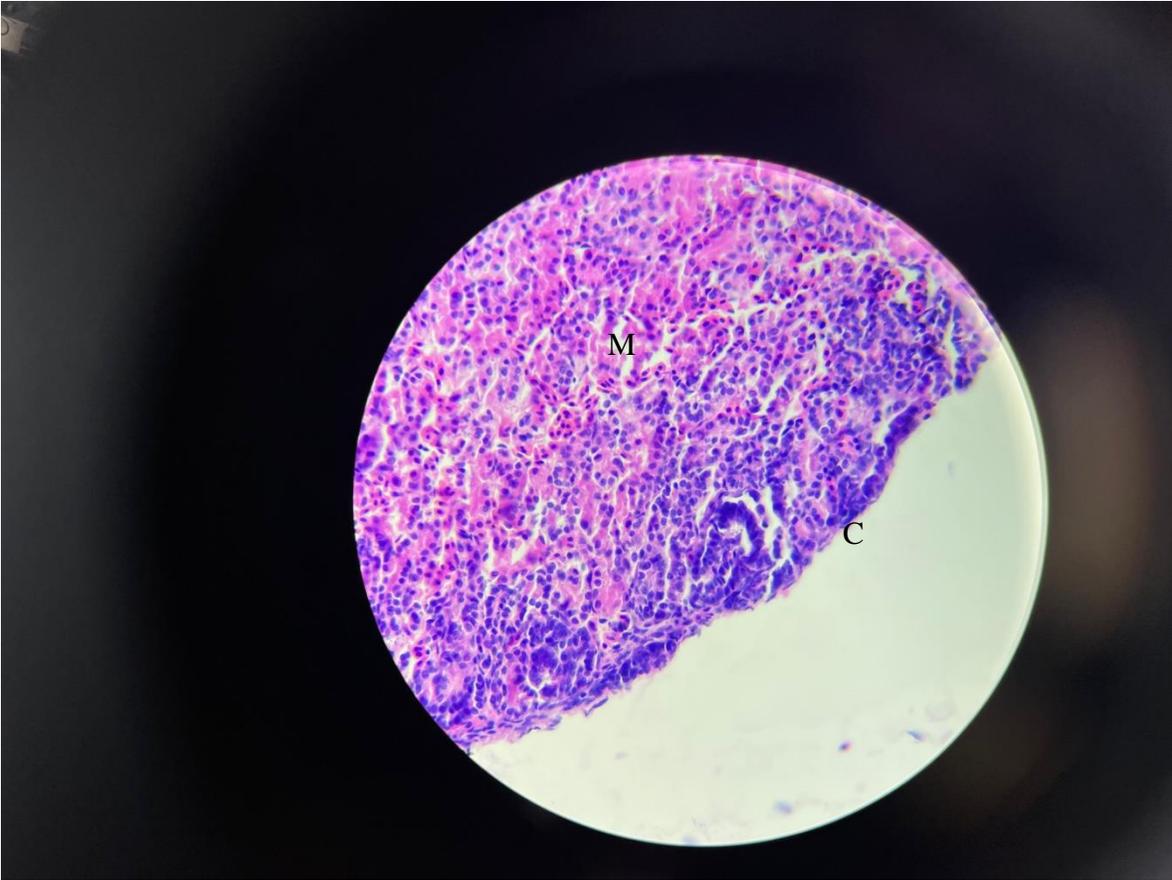


Figura 61. Ovario de individuo #M19 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

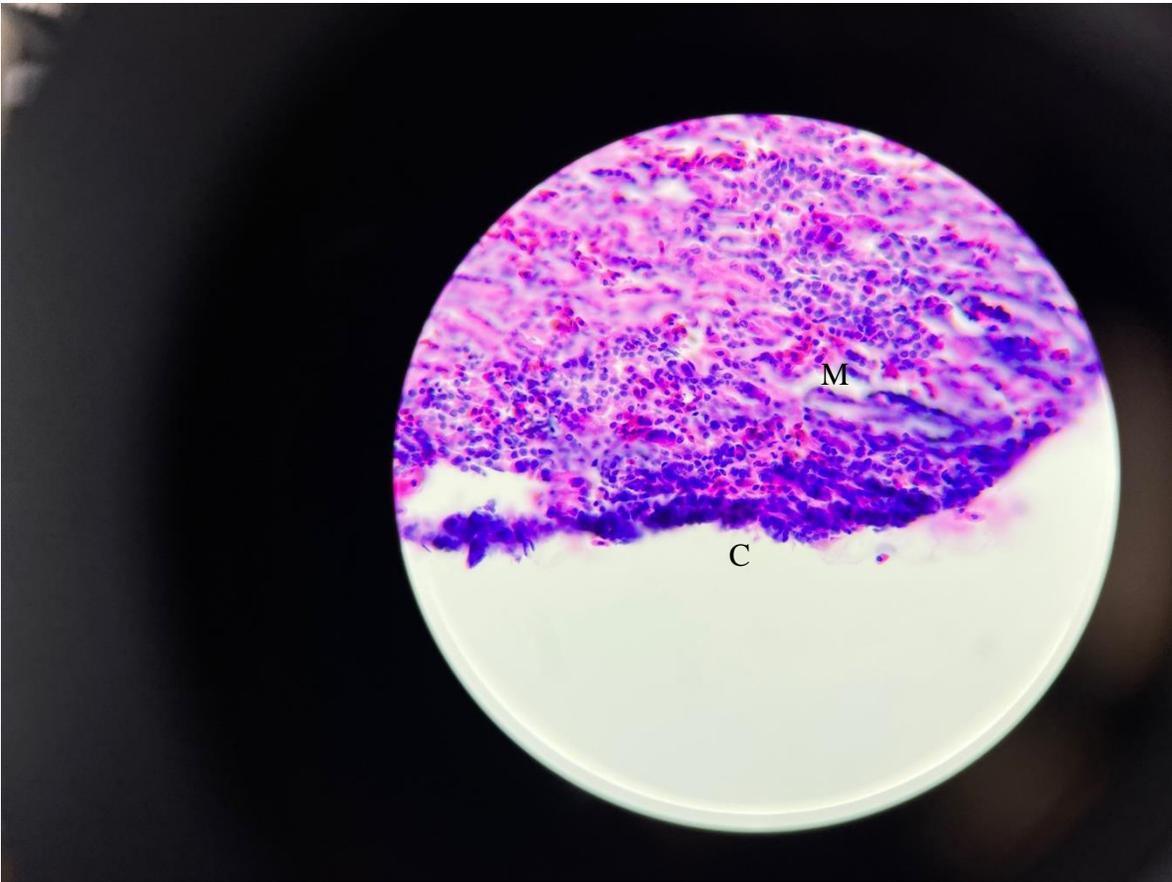


Figura 62. Ovario de individuo #20 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

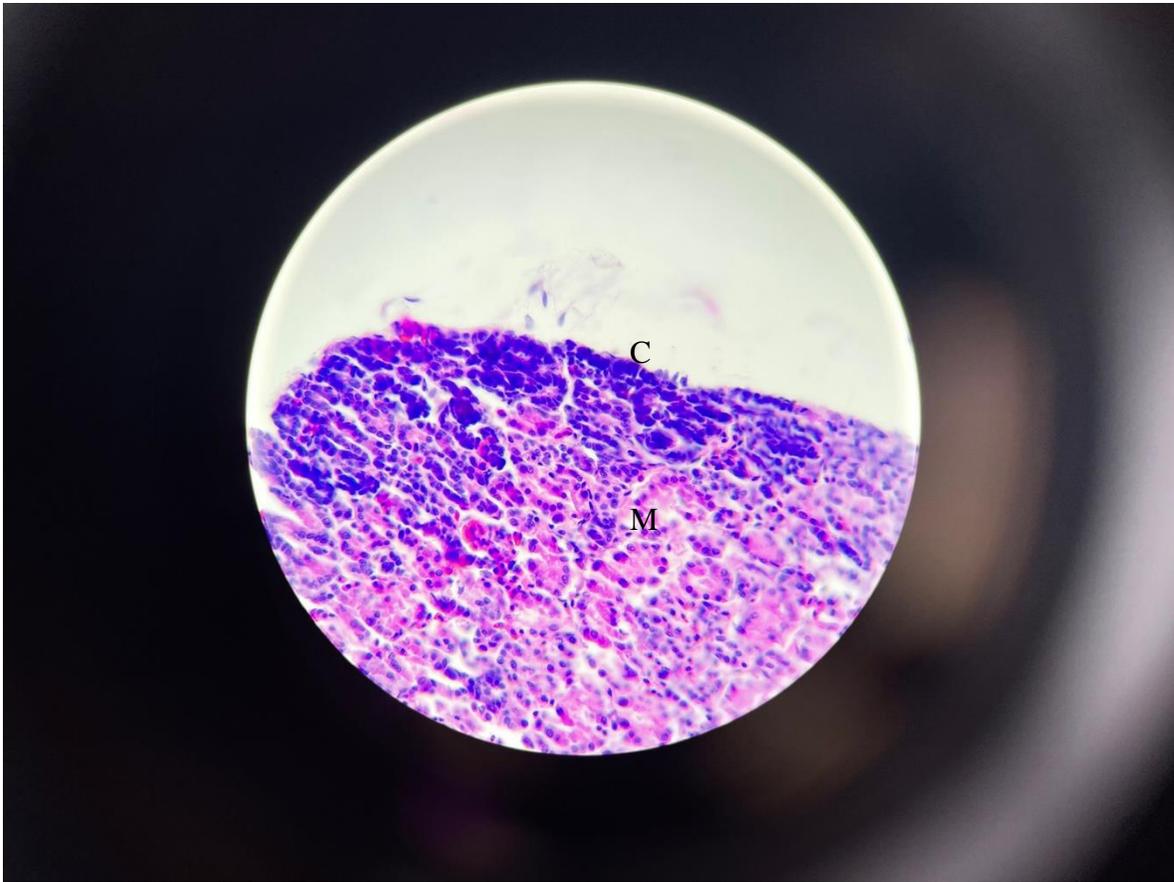


Figura 63. Ovario de individuo #8 del nido 1809 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

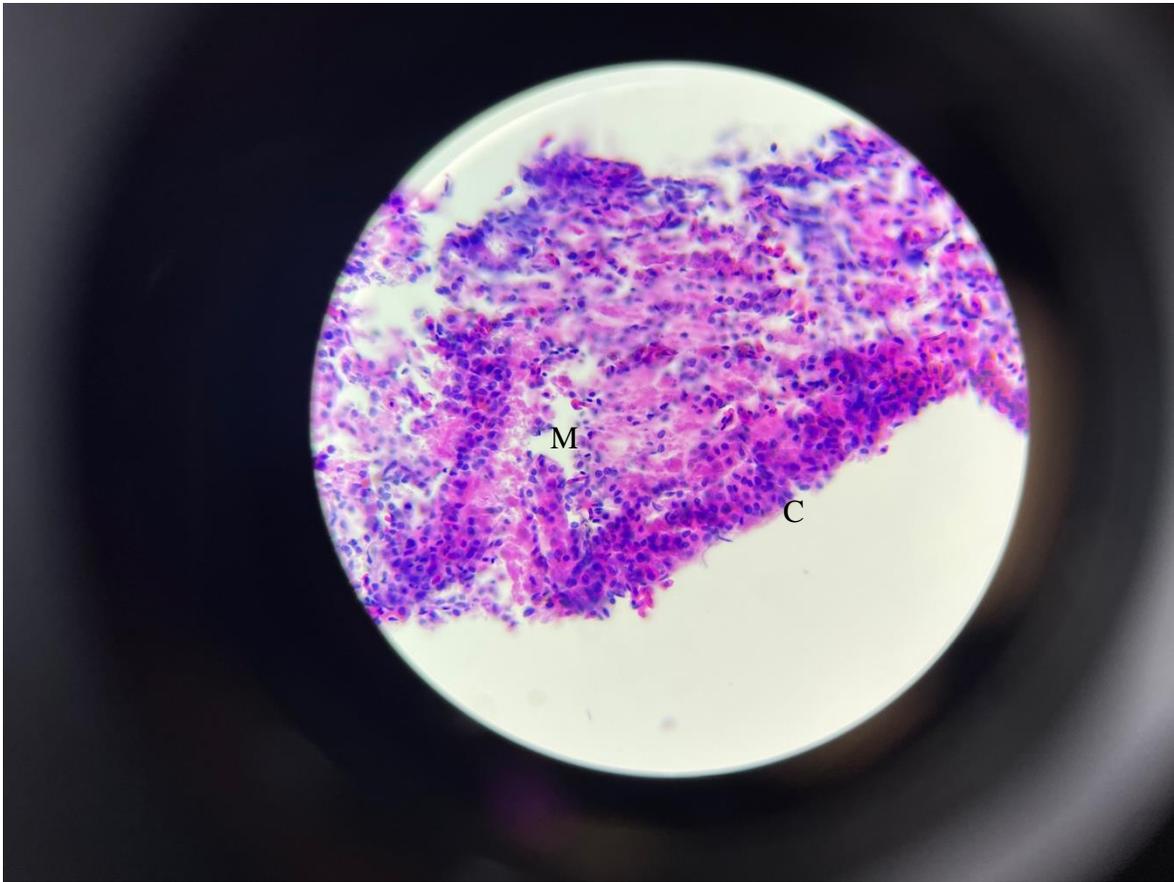


Figura 64. Ovario de individuo #14 del nido 1809 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

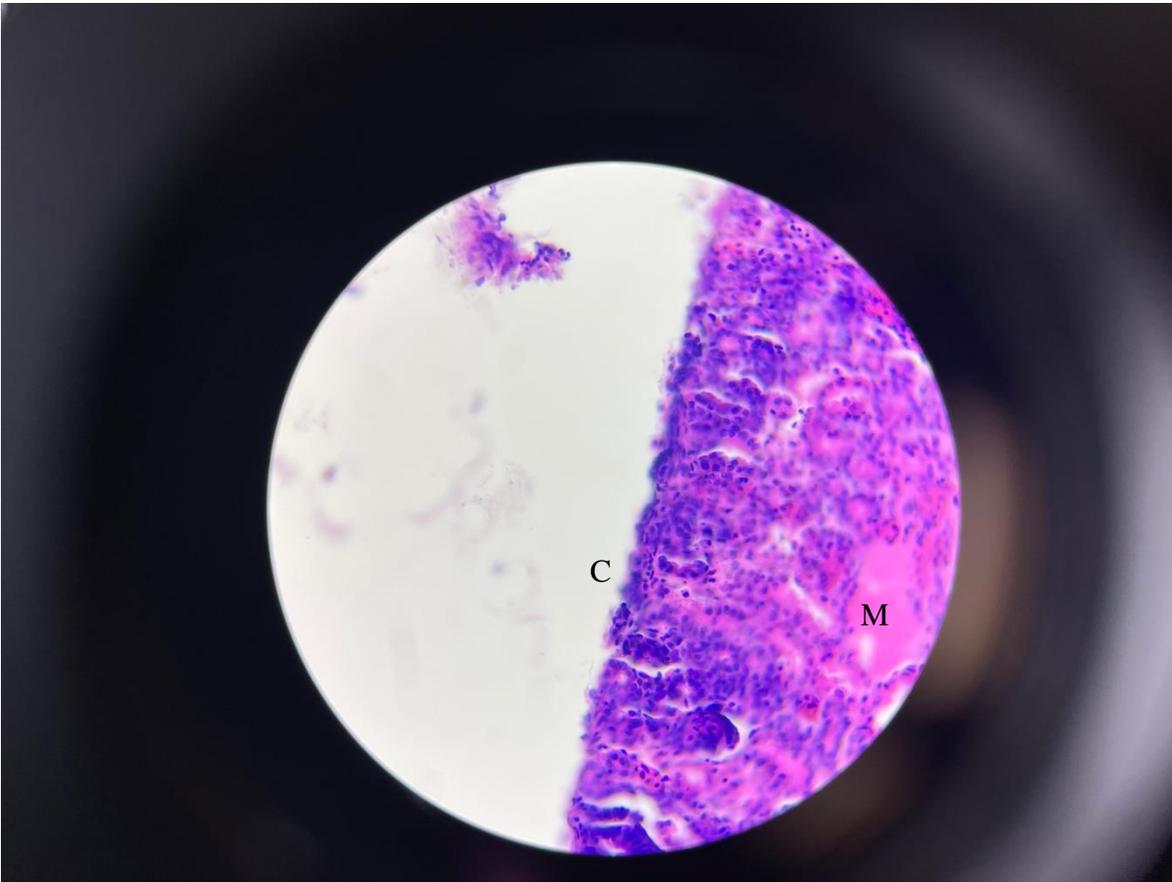


Figura 65. Ovario de individuo #16 del nido 1809 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 40X

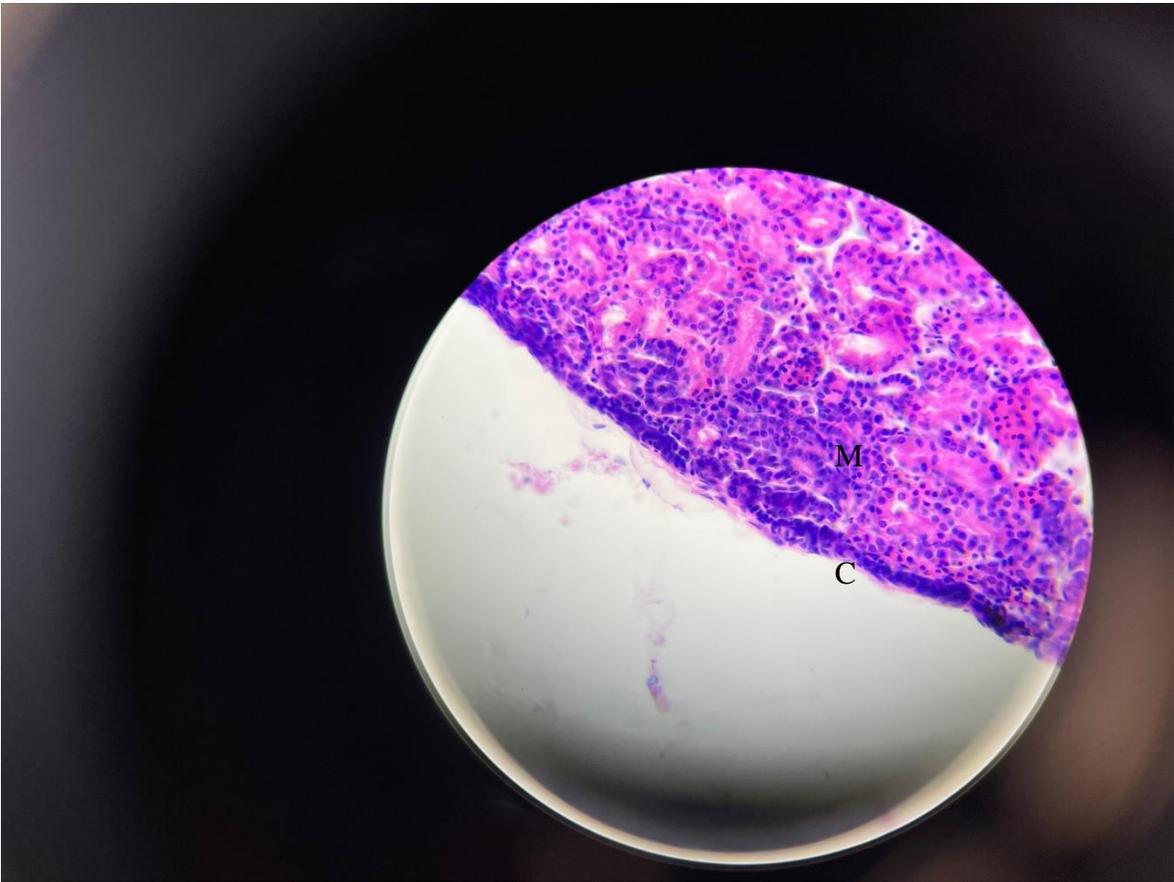


Figura 66. Testículo de individuo #18 del nido 1818 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza poco desarrollada (C) y una médula organizada (M). 40X

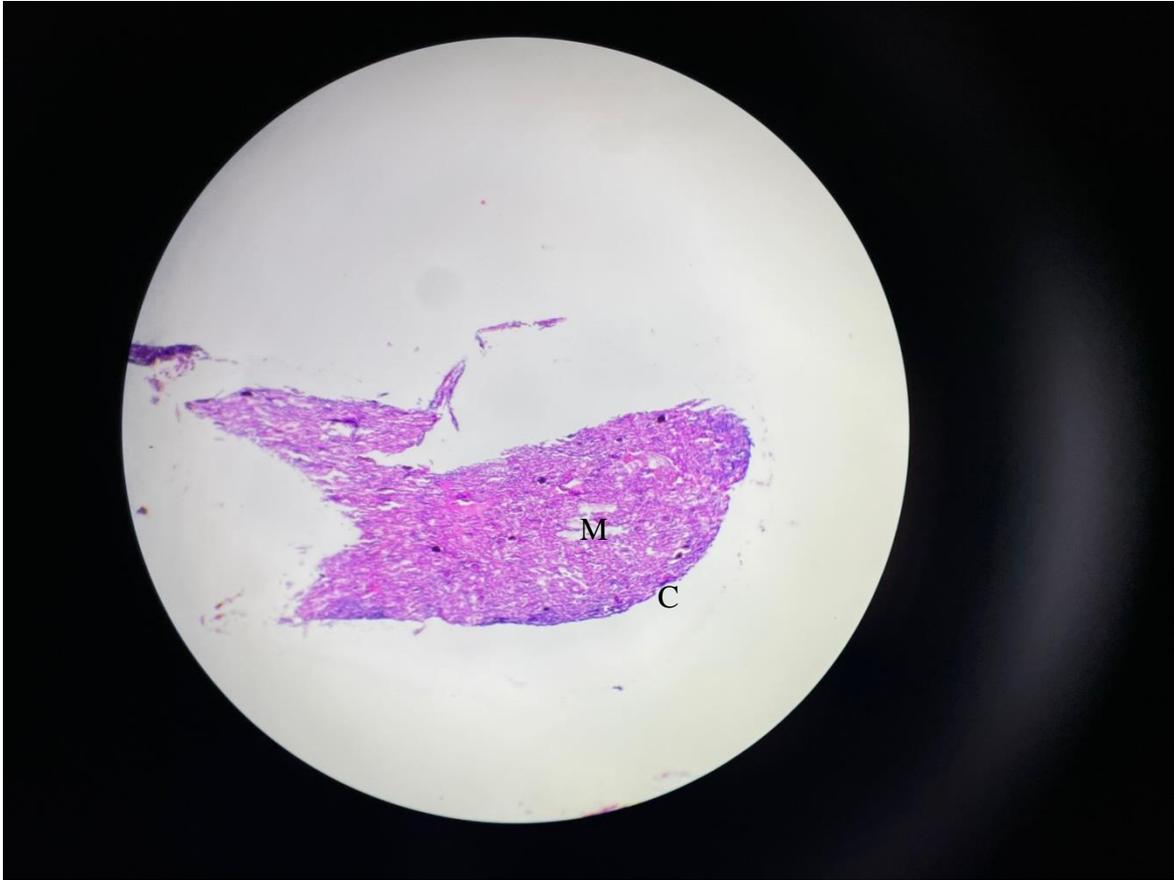


Figura 67. Ovario de individuo #21 del nido 1815 de *L. olivacea* teñido con H/E. Se puede observar la corteza bien desarrollada formada por tres-cuatro capas de células basófilas (C) y una médula desorganizada (M). 10X