



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales

Maestría en Ciencias en Ecología Integrativa

**“Efecto materno y de la condición de incubación sobre la respuesta
inflamatoria de crías de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* a la
emergencia”**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Ecología Integrativa

PRESENTA

M.V.Z. Irma Yunuen Garcia Bucio

Directora: Dra. Esperanza Meléndez Herrera

Comité tutorial:

Dra. Ileri Suazo Ortuño. MCEI-UMSNH

Dr. Eduardo Mendoza Ramírez. MCEI-UMSNH

Dr. Bryan Víctor Phillips Farfán. INP

Dr. Jorge Contreras Garduño. ENES MORELIA-UNAM

Morelia, Michoacán, noviembre 2023.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo de manutención del que fui beneficiaria y a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

A todas las personas y las instituciones a las que se encuentran adscritas que fueron participes directa e indirectamente en este proyecto.

A mi familia y amigos que fueron aliento en este proceso de crecimiento profesional y personal.

“El amor por todas las criaturas vivientes es el más noble atributo del hombre”

-Charles Darwin-

CONTENIDO

I.	Resumen general	1
	Abstract	3
II.	Introducción	5
II.1	Antecedentes	7
II.1.1	Talla corporal	7
II.1.2	Sistema inmunitario de los reptiles	7
II.1.2.1	Inflamación	9
II.1.2.2	Órganos linfoides de los reptiles	10
II.1.3	Factores que determinan el fenotipo de las crías	11
II.1.3.1	Componente materno	11
II.1.3.2	Temperatura	12
III.	Planteamiento de hipótesis	16
IV.	Objetivos	17
IV.1	Objetivo general	17
IV.2	Objetivo específico	17
V.	Materiales y métodos	18
VI.	Resultados	26
VII.	Discusión	34
VIII.	Conclusión	38
IX.	Referencias bibliográficas	39

I. RESUMEN GENERAL

Las poblaciones de tortugas marinas se mantienen en diferentes grados de vulnerabilidad. La reubicación de los huevos a viveros protegidos con sombra es una de las principales estrategias de conservación para evitar la depredación, las amenazas climáticas y el saqueo. Sin embargo, esta estrategia sesga las proporciones sexuales y modifica en grados variables el desarrollo embrionario con respecto a la incubación natural. Algunos de los efectos previamente descritos son: el desarrollo adelantado del bazo, el incremento en las poblaciones de heterófilos en circulación, la menor actividad oxidante-antioxidante y la expresión diferencial de marcadores de estrés térmico en el hígado y bazo. Sin embargo, aún se desconoce si esta configuración diferencial: 1) está asociada con una mejor respuesta inmunitaria; o determinada por 2) viveros con sombra; 3) la condición nutricional de la madre; 4) una interacción entre el ambiente de incubación y el componente materno. Debido a que uno de los mecanismos más robustos para responder a los patógenos y contaminantes es la inflamación, el presente proyecto evaluó: 1) la respuesta inflamatoria a la inoculación con fitohemaglutinina (PHA); 2) la expresión de marcadores de estrés térmico y proinflamatorios en hígado y bazo; y 3) la talla corporal de crías de tortuga marina provenientes de la misma madre incubadas en vivero (sin sombra o sombreado). Además, se evaluó la inversión reproductiva de las madres, así como la supervivencia (éxito de emergencia y eclosión) y el sexo de las crías. Adicionalmente, se registró la temperatura al interior de algunos nidos seleccionados. El efecto materno fue evaluado a través de la talla corporal de las madres, hematocrito, perfil leucocitario y 16 indicadores de química sanguínea. El efecto de estos indicadores, la condición de incubación y su interacción sobre cada una de las variables de respuesta de las crías fue evaluada mediante modelos lineales mixtos. Los resultados muestran que la longitud corporal y algunos indicadores nutricionales de las hembras anidantes en interacción con el ambiente incubatorio explican la longitud corporal de las crías y la expresión diferencial de genes de estrés térmico y de inflamación bajo condiciones basales. Por su parte, la condición de incubación es el único factor que explica la masa corporal, la inflamación, el sexo y el éxito de supervivencia en crías, y tiene un efecto sobre la longitud corporal y la expresión de genes asociados a inflamación en bazo e hígado en interacción con el componente materno. La temperatura fue mayor en los nidos

sin sombra. Estudios subsecuentes evaluarán si los efectos del ambiente son dependientes de la temperatura de incubación o están ligados al sexo de las crías . En conjunto, los resultados sugieren un efecto anticipatorio de las madres modulado por el ambiente, y destacan la relevancia de evaluar el efecto de la reubicación en viveros sobre la inmunocompetencia y el tamaño corporal de las crías.

Palabras clave: sistema inmunitario, incubación *ex-situ*, talla corporal, temperatura

ABSTRACT

Sea turtle populations remain at varying degrees of threat. The relocation of eggs to shaded nests is one of the main conservation strategies to avoid predation, climatic threats and poaching. However, this strategy skews the sexual proportions and modifies embryonic development to varying degrees with respect to natural incubation. Some of the previously described effects are: advanced spleen development, increased circulating heterophil populations, lower oxidant-antioxidant activity and differential expression of heat stress markers in the liver and spleen. However, it is still unknown if this differential configuration: 1) is associated with a better immune response; or is determined by 2) nest shading; 3) the nutritional condition of the mother; 4) an interaction between the incubation environment and the maternal component. Because one of the most robust mechanisms to respond to pathogens and contaminants is inflammation, the present project evaluated: 1) the inflammatory response to inoculation with phytohemagglutinin (PHA); 2) the expression of heat-stress and proinflammatory markers in the liver and spleen of sea turtle hatchlings from the same mother incubated in (Unshaded or Shaded) hatcheries. In addition, the reproductive investment of mothers, as well as the survival (emergence and hatching success) and sex of hatchlings were evaluated. Additionally, the temperature was registered inside some selected nests. The maternal effect was evaluated by the mothers' body size, hematocrit, leukocyte profile and 16 blood chemistry indicators. The effect of these indicators, the incubation condition and their interaction on each of the response variables of hatchlings was evaluated with mixed linear models. The results showed that body length and some maternal nutritional indicators were correlated with their reproductive investment. They also explained hatchling body length, as well as the differential expression of heat stress and inflammation indicators under basal conditions. The incubation condition was the only factor that explained body mass, inflammation, sex and survival success in hatchlings. It affected the remaining hatchling variables in interaction with the maternal component. Temperature was significantly higher in the unshaded nests. Subsequent studies will evaluate whether the effects of the environment are dependent on the incubation temperature or are linked to the sex of hatchlings. Taken together, the results suggest an anticipatory effect of mothers modulated by the environment, and

highlight the relevance of understanding the effect of nest relocation on hatchling immunocompetence and body size.

II. INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas enfrentan un grave declive de sus poblaciones. Actualmente seis de las siete especies se encuentran en peligro de extinción. Por ejemplo, *Lepidochelys olivacea* se encuentra en estado vulnerable con poblaciones decrecientes (Abreu-Grobois & Plotkin, 2008). La incubación en playa y la fase de dispersión de las crías se consideran los periodos más críticos en la historia de vida de las tortugas marinas (Gatto *et al.*, 2020). Por lo anterior, se han establecido diversas estrategias de conservación entre las que destaca la reubicación de los huevos a viveros con la finalidad de protegerlos de depredadores, eventos ambientales y saqueos (Namnum, 2002; Abreu-Grobois & Plotkin, 2008). Sin embargo, varios estudios han sugerido que el ambiente de incubación de los huevos *ex-situ* altera el desarrollo cerebral, gonadal y la configuración inmunitaria de las crías (Herrera-Vargas *et al.*, 2017; Arzola-González *et al.*, 2019; Robledo-Avila *et al.*, 2022; Unda-Díaz *et al.*, 2022).

Las tortugas marinas se desarrollan en ambientes con alta densidad de patógenos, contaminantes y depredadores. Para aumentar la probabilidad de supervivencia, las crías deben contar con un estado fisiológico óptimo que les permita desplazarse rápidamente, y un sistema inmunitario altamente eficiente que responda a infecciones y agentes tóxicos (Smith *et al.*, 2017). El desarrollo embrionario del tamaño corporal y la inmunocompetencia en organismos ectotérmicos es probablemente el resultado de la interacción entre la transferencia genética, la calidad y cantidad de nutrientes en el huevo y el ambiente de incubación (Booth *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2019; Martín-del-Campo *et al.*, 2021). Reportes recientes en lagartijas sugieren que la condición física de las madres al momento de la oviposición puede determinar la inmunocompetencia de las crías a través de la transferencia de inmunomoduladores que las preparan para ambientes con alta densidad de patógenos (Hasselquist & Nilsson, 2012; Brown & Shine, 2016; Virgin *et al.*, 2022). Algunos estudios, además, sugieren una relación entre la condición física de la madre, la inversión reproductiva (número de huevos, masa de los huevos), el tamaño corporal y la inmunocompetencia de las crías (Virgin *et al.*, 2022).

Se ha descrito un efecto de la incubación en nidos *ex-situ* sobre el fenotipo y la adecuación de las crías de tortugas a la emergencia del nido, además de sesgos en la

determinación sexual. Dado que los viveros habitualmente están protegidos con malla sombra, y la temperatura de los nidos se encuentra varios grados por debajo de los nidos naturales sin sombra, algunos de estos efectos han sido asociados a la temperatura de incubación (p.ej. Robledo-Avila *et al.*, 2022). Debido a la creciente necesidad de proteger a las tortugas marinas de la depredación, el saqueo, las consecuencias del cambio climático durante su incubación embrionaria, y los altos índices de contaminación con potencial disruptor endocrino que afectan a las hembras anidantes, es necesario evaluar el efecto de factores como la temperatura y la condición materna sobre indicadores de condición fisiológica e inmunocompetencia. Este estudio pretende identificar variables maternas que ayuden a predecir la condición fisiológica de las crías y dilucidar la interacción de éstas con el ambiente incubatorio sobre el tamaño corporal y la inmunocompetencia de las crías.

II.1 ANTECEDENTES

II.1.1 Talla corporal

La supervivencia de las crías de tortuga marina durante la fase de dispersión está condicionada a sus aptitudes locomotoras, ya que no cuentan con otro medio de defensa contra depredadores. En múltiples estudios se ha asociado el tamaño del caparazón y de las aletas con su capacidad de desplazamiento en tierra y nado. La velocidad con la que se alejan de las zonas con alta densidad de depredadores aumenta su probabilidad de sobrevivir: las más grandes son más rápidas (excepto en el caso de la especie *Dermochelys coriacea* (Fleming *et al.*, 2020; Le Gouvello *et al.*, 2020). El autoenderazamiento es otra aptitud importante en la fase de dispersión que también podría verse influenciada por el tamaño del caparazón (Booth *et al.*, 2012; Fleming *et al.*, 2020; Unda-Díaz *et al.*, 2022).

El rendimiento locomotor a la emergencia del nido es el resultado de varios procesos fisiológicos entre los que se encuentran el crecimiento y las reservas energéticas con las que cuentan las crías. Las compensaciones entre talla corporal-reservas energéticas podrían condicionar el beneficio de mayor tamaño. Así, crías con mayor tamaño y menor yema residual podrían tener un periodo de ayuno menor que el de las crías con menor tamaño y mayor cantidad de nutrientes de reserva. Debido a que la fase de dispersión puede durar varios días, las crías con mayor cantidad de yema podrían sobrevivir periodos de ayuno prolongados (Amaral *et al.*, 2012; Fleming *et al.*, 2020; Le Gouvello *et al.*, 2020). En conjunto, estas características incrementan su capacidad de supervivencia en zonas con alta densidad de depredadores (Gatto *et al.*, 2022). En este contexto, las reservas energéticas también podrían condicionar procesos altamente demandantes como la respuesta inmunitaria (Bílková *et al.*, 2015).

II.1.2 Sistema inmunitario de reptiles

La inmunocompetencia es la capacidad que tienen los organismos para diferenciar lo propio de lo extraño, resolver eficientemente los retos infecciosos y los no infecciosos y evitar el daño tisular (Owen *et al.*, 2007; Zimmerman, 2020). Esto se logra sensando el ambiente a través de receptores celulares localizados en todo el cuerpo capaces de

identificar microorganismos patógenos, proliferación celular anormal, elementos no funcionales y daño tisular (Nicholson, 2016). El sistema inmunitario consta de una red de órganos, células, moléculas y mecanismos altamente específicos, los cuales se clasifican en dos principales respuestas: innata y adaptativa. La separación entre estas respuestas en ocasiones es difícil de identificar debido a que están interconectadas y comparten algunas vías de activación y mecanismos efectores (Owen *et al.*, 2007).

Existe evidencia de inmunidad innata en todo el reino animal, y aunque se pensaba que la adaptativa estaba restringida a vertebrados (Boehm *et al.*, 2012), ahora se sabe que se encuentra en el reino animal (Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2021). En vertebrados, el sistema inmunitario de los reptiles se considera el menos estudiado, pero se sabe que consta de una respuesta innata consistente y una respuesta adaptativa más lenta y específica (Rios & Zimmerman, 2015; Mešťanová & Varga, 2016). Tanto la inmunidad innata como la adaptativa mejora con la exposición al mismo patógeno o sustancia extraña frecuente (Mešťanová & Varga, 2016). La respuesta innata es la principal defensa en reptiles (Riera-Romo *et al.*, 2016). Los componentes de la respuesta innata son en primer lugar un tegumento queratinizado y otros epitelios que funcionan como barrera contra patógenos. Cuando los microorganismos vulneran estas defensas, activan mecanismos efectuados por leucocitos inespecíficos, péptidos antimicrobianos y lisozimas (Owen *et al.*, 2007; Rios & Zimmerman, 2015). Los mecanismos efectores de esta respuesta son la defensa antiviral, la lisis, la fagocitosis y la inflamación (Rousselet *et al.*, 2013; Hart *et al.*, 2016).

La respuesta adaptativa consta de linfocitos T, B y anticuerpos producidos por estas células. En reptiles se han descrito los isotipos IgA, IgD, IgM e IgY. Sin embargo, su producción es más tardía y la especificidad no mejora con la exposición en comparación con los mamíferos (Zimmerman *et al.*, 2010; Rios y Zimmerman *et al.*, 2015). Adicionalmente, los reptiles producen anticuerpos naturales que son poli reactivos, lo que les confiere el poder de reconocer una amplia gama de antígenos. Estos anticuerpos son producidos por los linfocitos B y forman parte de la inmunidad humoral (Zimmerman, 2018).

II.1.2.1 Inflamación

La inflamación es uno de los mecanismos efectores más importantes en la respuesta innata, y es definida como la acumulación de células y proteínas en el sitio de infección o daño (Sheran & Petasis, 2011). Esta respuesta inicia cuando las barreras epiteliales son vulneradas por los microorganismos, los cuales son reconocidos por células residentes y circulatorias a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRP). Los RRP se localizan en las membranas de una amplia variedad de células como fagocitos (monocitos, células dendríticas y neutrófilos en los mamíferos) y los demás leucocitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos). Los RRP reconocen patrones asociados a patógenos o daño y se han descrito varios grupos, entre ellos los receptores tipo toll (TLR). Algunos de estos receptores desencadenan directamente la fagocitosis, como por ejemplo los receptores de opsoninas, y otros son encargados de iniciar vías de señalización que inducen inflamación u otros mecanismos innatos (Owen *et al.*, 2007). Estas señales liberadas en el sitio de lesión incluyen quimiocinas (IL-8), agentes vasoactivos (TNF- α), citocinas proinflamatorias (IL-1,6,10,12,18), prostaglandinas, histamina y otros mediadores de la inflamación. Las moléculas proinflamatorias tienen la finalidad de reclutar más células y mediadores de defensa, por lo que pueden interactuar con los vasos sanguíneos locales para hacerlos más permeables y promover el reclutamiento de leucocitos. Estos cambios en los vasos sanguíneos locales generan en la zona edema, calor, rubor, dolor y pérdida de función, que son las características de la inflamación (Owen *et al.*, 2007). Las vías de señalización inflamatoria han sido utilizadas como marcadores inmunotóxicos en tortugas *Caretta caretta*. Cocci *et al.* (2022) demostraron que existe un aumento en la expresión de los genes *tlr1* y *tlr2* así como los genes que se activan con esta cascada inflamatoria (i.e., *rac1*, *pi3k*, *akt3* y *nfkb*) cuando las tortugas están expuestas a agentes contaminantes.

La inflamación se encuentra altamente regulada, y para que sea homeostática, después de un reto infeccioso o daño tisular debe iniciar rápidamente, incrementar en intensidad y resolverse una vez que no exista amenaza para la integridad del tejido (Tizard, 2009; Sheran & Petasis, 2011). Para los reptiles, la inflamación se considera el mecanismo

efector más robusto, desencadenado principalmente por retos bacterianos. Esta respuesta está sometida a presión de selección en la que pueden intervenir tanto factores ambientales (p. ej., la temperatura o la estación) como intrínsecos (p. ej., el estado nutricional del individuo. Stacy *et al.*, 2011; Zimmerman, 2020).

La capacidad que tienen los organismos para iniciar y resolver una respuesta inflamatoria local se ha asociado a una buena respuesta inmunitaria (Muñoz *et al.*, 2013). La evaluación de este mecanismo comúnmente se realiza con la inoculación de fitohemaglutinina (PHA) intradérmica o subcutánea. La PHA es un derivado de frijol que funciona como antígeno, aumenta la permeabilidad en el sitio de inoculación, genera migración de leucocitos y es mitógeno para una población especializada de leucocitos denominados linfocitos T locales. La respuesta inflamatoria inicial se considera una respuesta innata primaria inespecífica (Finger *et al.*, 2013). En tortugas marinas de la especie *Chelonia mydas* se ha demostrado la infiltración de leucocitos, entre ellos linfocitos T, en piel inoculada previamente con PHA (Muñoz *et al.*, 2009). Asimismo, se demostró que tortugas clínicamente sanas presentaron una inflamación más pronunciada después de la administración subcutánea de PHA comparadas con tortugas positivas a dermatitis ulcerativa (Muñoz *et al.*, 2013). En *Trachemys scripta* la inflamación provocada por la administración de PHA presentó diferencias entre las estaciones del año, pero no estuvo asociada con la temperatura, el sexo ni con el tamaño corporal (Zimmerman *et al.*, 2010).

II.1.2.2 Órganos linfoides de reptiles

Los componentes del sistema inmunitario innato se originan en la línea germinal en etapas tempranas de la ontogenia (Tizard, 2007; Mešťanová & Varga, 2016). Los órganos linfoides primarios descritos en los reptiles incluyen a la médula ósea y al timo. Estos órganos poseen función hematopoyética y son indispensables para la maduración de los linfocitos T, como ha sido descrito en mamíferos. Por su parte, los reptiles también poseen como órganos linfoides secundarios al bazo y al tejido asociado a mucosas (Zimmerman *et al.*, 2010). Se han identificado nódulos linfáticos primitivos que a diferencia de los mamíferos no tienen centros germinales y no están presentes en todas las especies de reptiles (Boehm *et al.*, 2012; Mešťanová & Varga, 2016).

En reptiles, el bazo es un órgano indispensable para la expresión de la respuesta humoral dependiente de linfocitos B (Zimmerman *et al.*, 2010; Boehm *et al.*, 2012). En algunos reptiles el bazo cumple función eritropoyética, de filtración y depuración de eritrocitos longevos (Zhang *et al.*, 2015; 2016; Zimmerman, 2018). Asimismo, el hígado fetal tiene funciones linfoideas ya que produce linfocitos, y ya maduro, participa activamente en la vigilancia inmunitaria al ser un filtro de sustancias tóxicas o patógenas provenientes del sistema digestivo. En el hígado también se producen proteínas proinflamatorias de fase aguda como proteína C reactiva, quimiocinas, citocinas y componentes del sistema del complemento (Owen *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2022). Se ha documentado la involución estacional de órganos como el timo y el bazo en reptiles (Zimmerman *et al.*, 2010).

II.1.3 Factores que determinan el fenotipo de las crías

Los fenotipos morfológicos e inmunitarios son el resultado de la interacción entre el origen materno y el microambiente de incubación (Booth *et al.*, 2012; Dang *et al.*, 2015; Stewart *et al.*, 2019; Tezak *et al.*, 2020; Martín-del-Campo *et al.*, 2021).

II.1.3.1 Efecto materno

El componente materno incluye la transferencia genética, los recursos invertidos en los huevos como nutrientes, anticuerpos, antioxidantes y hormonas. La cantidad y calidad de los recursos depositados en los huevos podría estar condicionada por el estado de salud materno, su condición corporal o nutricional (Hasselquist & Nilsson, 2009; Brown & Shine, 2016). En el caso de las tortugas marinas el componente paterno es más complejo de determinar debido a que las nidadas son poliándricas (Núñez *et al.*, 2015).

La reproducción se considera evolutivamente costosa, por lo que es necesaria la capacidad alostática de las hembras para mantener un buen estado energético e inmunitario (Hudson, 2020). La fisiología materna puede influir sobre el fenotipo de su descendencia de acuerdo con el componente genético, el comportamiento y los recursos que tienen las hembras para transferir a los huevos (Ensminger *et al.*, 2018). Se considera que estos componentes determinan la negociación entre el número y tamaño de los huevos, dado que los recursos disponibles para invertir son limitados. Así, menor número de huevos permite invertir mayor recurso en cada uno, mientras un mayor número de

huevo implica menor inversión. A pesar de ello, el tamaño del huevo se considera un rasgo de historia de vida determinado genéticamente (Brown y Shine, 2009). Un estudio en tortugas *Lepidochelys olivacea* muestra que el tamaño de las crías está determinado por el tamaño materno más que por el peso del huevo (Gatto *et al.*, 2020). Sin embargo, estudios en otros reptiles sugieren que la masa del huevo determina el tamaño de la descendencia (Brown & Shine, 2009; Warner *et al.*, 2010).

El inicio de la foliculogénesis en reptiles está determinado por diversos factores como el fotoperiodo, la temperatura ambiental y la regulación intrínseca endocrina que la inhibe (p. ej., la respuesta al estrés) o la estimula (p.ej., altos niveles de estrógenos). La vitelogenesis implica una alta movilización de recursos para formar la yema a partir de vitelogenina, proteína producida en el hígado que depende de una condición corporal materna apropiada. La función hepática, así como el metabolismo del calcio y del fósforo materno, están fuertemente involucrados en la producción de huevos (Jones, 2011; King *et al.*, 2020). Se ha sugerido que la condición física de las madres al momento de la oviposición puede influir en el desarrollo de la inmunocompetencia de las crías al transferir componentes inmunomoduladores (Hasselquist & Nilsson, 2012; Brown & Shine, 2016; Virgin *et al.*, 2022). Se han correlacionado indicadores del estado de nutrición de las hembras (p. ej., índice de condición corporal) y diversos analitos sanguíneos con el rendimiento reproductivo en *Dermochelys coriacea* (Perrault *et al.*, 2020). Algunos estudios, además, sugieren una relación entre la condición física de la madre, la inversión reproductiva (número y masa de los huevos), el tamaño corporal y la inmunocompetencia de las crías (Virgin *et al.*, 2022).

II.1.3.2 Temperatura de incubación

Por su naturaleza ectotérmica, la ontogenia de los reptiles es altamente dependiente del ambiente de incubación (Gatto & Reyna, 2020; Tezak *et al.*, 2020). El microambiente de incubación se compone de la forma y tamaño del nido, las características del sustrato, la humedad, microorganismos en los nidos y una de las principales variables de interés es la temperatura de incubación (Arzola-González, 2007; Sarmiento-Ramírez *et al.*, 2014; Herrera-Vargas *et al.*, 2017; Kobayashi *et al.*, 2018).

La temperatura influye en diversas funciones biológicas, por lo que los umbrales de resistencia y eficiencia fisiológica en función de este parámetro (p.ej. la actividad enzimática y el consumo de oxígeno) están bajo presión de selección (Willmer *et al.*, 2005). Las temperaturas de incubación son cruciales para el óptimo desarrollo embrionario de las tortugas marinas. Las temperaturas extremas podrían dar lugar a fenotipos aberrantes y condicionar la supervivencia de las crías post-eclosión o provocar la muerte embrionaria (Martín-del-Campo *et al.*, 2021). El efecto de la temperatura sobre los embriones dependerá de su intensidad, frecuencia, estadio de desarrollo y duración del estrés térmico (Loriux *et al.*, 2013; Sim *et al.*, 2015; Martín-del-Campo *et al.*, 2021).

Los mecanismos por los que la temperatura tiene efectos teratogénicos aún no son muy claros (Martín-del-Campo *et al.*, 2021). Se ha documentado que el estrés térmico puede reducir la expresión de genes asociados al desarrollo e inducir daño molecular a proteínas y lípidos (Bentley *et al.*, 2017). Por lo anterior, durante la embriogénesis son de especial interés los mecanismos protectores a macromoléculas como los efectuados por las proteínas de choque térmico (HSP) y el sistema que regula el equilibrio oxidante-antioxidante. Las HSP son un grupo de proteínas que aumentan su expresión cuando las células se encuentran bajo algún estresor sin ser exclusivamente de respuesta térmica. Su efecto protector incluye el plegamiento correcto de proteínas y la eliminación de aquéllas que no lo están. Estas proteínas se clasifican por su peso molecular siendo las más grandes (HSP60, HSP70 y HSP90) las de respuesta a estrés térmico. La HSP70 además se expresa de forma constitutiva influyendo en la muerte celular programada (Willmer *et al.*, 2005; Ramiah *et al.*, 2022).

Las HSP funcionan como chaperonas moleculares que sensan la estructura proteica reconociendo regiones hidrófobas expuestas, a las que se adhieren para promover su corrección o eliminación (Lang *et al.*, 2021). El aumento de la expresión de las HSP es dependiente de un factor de transcripción llamado factor de choque térmico (HSF, por sus siglas en inglés). El HSF cambia en estructura y se hiperfosforila bajo estrés por temperatura, lo que activa una región promotora de las HSP y aumenta su expresión. Durante la respuesta al estrés térmico se estabilizan las HSP y su vida útil se prolonga para conferir protección aún después del evento de estrés (Lang *et al.*, 2021).

Se ha sugerido que las HSP pueden ser también centinelas del estado redox del organismo (Madeira *et al.*, 2013). Durante la embriogénesis, por el metabolismo celular aerobio se producen radicales libres llamados especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Las ROS incluso forman parte esencial de rutas de señalización del desarrollo embrionario en los mamíferos y se considera a la línea germinal extremadamente sensible a cambios en su balance (Denery, 2010). Para responder a estresores oxidantes intrínsecos o extrínsecos como el choque térmico, las células despliegan sus defensas enzimáticas antioxidantes mediadas por los promotores nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) y kappa-light-chain enhancer of activated B cells (NFkb. Seis, 2018). Las enzimas antioxidantes son superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasas, las cuales son dependientes de glutatión y se ha sugerido incluso que las HSPs participan en su activación. Las células también pueden hacer uso de antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas A, E, C, K y aminoácidos. Cuando las ROS superan las defensas antioxidantes se produce el estrés oxidante (Madeira *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2021). El estrés oxidante es un estado tóxico para las células en el que las ROS provocan daño a proteínas, lípidos y al ADN, lo que compromete la vida de la célula y la vida del organismo (Denery, 2010; Madeira *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2021).

Durante el desarrollo embrionario los reptiles dependen de estas respuestas para su desarrollo y supervivencia. Asimismo, la eficiencia fisiológica de los adultos se programa desde el desarrollo temprano, por lo que estas respuestas pueden conferir tolerancia térmica en edad adulta, influir en las tasas de crecimiento e incluso heredar el umbral térmico a las siguientes generaciones (Tedeschi *et al.*, 2016).

Se ha descrito una relación entre las temperaturas de incubación elevadas y la disminución en: a) la actividad hemolítica del sistema del complemento y b) la expresión de genes relacionados con la función inmunológica (p. ej., IgD, IgM, and CD3 γ) en el hígado de tortugas de caparazón blando (Freedberg *et al.*, 2008; Dang *et al.*, 2015). En crías de tortugas marinas *Caretta caretta* se ha demostrado que la incubación en temperaturas por encima de los 32° C incrementa el número absoluto de heterófilos, basófilos, y otros parámetros relacionados con la inflamación (Fleming *et al.*, 2020). Una relación entre mayor temperatura de incubación y menor talla corporal ha sido bien

establecida (Warner, 2010; Booth *et al.*, 2012; Sim *et al.*, 2015; Booth, 2018; Stewart *et al.*, 2019; Fleming *et al.*, 2020; Tezak *et al.*, 2020). Adicionalmente, la temperatura de incubación puede sesgar las proporciones de sexos debido a que las tortugas marinas tienen diferenciación sexual dependiente de la temperatura. Se han descrito mecanismos epigenéticos en los que a temperaturas de incubación altas en el periodo termosensible y en presencia de Ca⁺⁺, se fosforila un activador de la transcripción llamado Stat3. Este factor inhibe la expresión del gen *Kdm6b* que es un activador del gen *Dmrt1*, lo que da paso a diferenciación a hembras (Weber *et al.*, 2020; Merchant-Larios *et al.*, 2021).

Trabajos recientes realizados por nuestro grupo apoyan la asociación entre la temperatura y la respuesta inmunitaria. Estos estudios muestran que la incubación *ex-situ* (asociada a temperaturas más bajas) promueve un mayor desarrollo de las crías a la emergencia del nido (medido por la talla corporal y la diferenciación esplénica, así como un incremento en la proporción de heterófilos en circulación. Robledo-Avila *et al.*, 2022). Asimismo, la incubación en viveros con malla sombra disminuye la actividad del sistema oxidante-antioxidante en las crías de tortuga marina a la emergencia del nido, e induce una expresión diferencial de las proteínas de choque térmico 70 y 90 en el hígado y el bazo. Sin embargo, la incubación en viveros no altera la capacidad hemolítica del sistema del complemento ni la actividad de la fosfatasa alcalina sérica en estas tortugas en condiciones basales (Robledo-Avila *et al.*, 2023).

En estudios de campo ha sido difícil separar el efecto materno del ambiente de incubación, por lo que se ha propuesto la estrategia de nidada dividida, con el objetivo de identificar efectos ambientales y/o parentales en rasgos de la descendencia (Booth *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2020). Usando esta estrategia, el presente estudio pretende: 1) identificar variables maternas que ayuden a predecir la condición fisiológica de las crías y 2) dilucidar la interacción de éstas con el ambiente incubatorio y su efecto sobre el tamaño corporal y la inmunocompetencia de las crías de tortuga *Lepidochelys olivacea* a la emergencia del nido.

III. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

La condición corporal materna, su nutrición y el ambiente de incubación determinan la capacidad inflamatoria, la talla corporal, la expresión de genes de inflamación en el hígado y bazo, el porcentaje de eclosión y emergencia de las crías de *Lepidochelys olivacea*.

Predicciones:

1. El índice inflamatorio es mayor en las crías provenientes de madres con mayor condición corporal, mayor concentración plasmática de indicadores nutricionales y emergidas de la condición de incubación con sombra.
2. La talla corporal es mayor en las crías provenientes de madres con mayor condición corporal, mayor concentración plasmática de indicadores nutricionales y emergidas de la condición de incubación con sombra.
3. La expresión de genes de inflamación es mayor en las crías provenientes de madres con mayor condición corporal, mayor concentración plasmática de indicadores nutricionales y emergidas de la condición de incubación con sombra.
4. El porcentaje de eclosión y emergencia es mayor en los nidos provenientes de madres con mayor condición corporal, mayor concentración plasmática de indicadores nutricionales e incubados con sombra.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Determinar la interacción entre el efecto materno y el ambiente de incubación sobre la capacidad inflamatoria, la talla corporal, la expresión de genes de inflamación, el porcentaje de eclosión y emergencia de crías de *Lepidochelys olivacea*.

IV.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto materno y de la condición de incubación sobre el tamaño corporal y la respuesta inflamatoria de las crías de tortuga *Lepidochelys olivacea* a la emergencia.
2. Evaluar el efecto materno y de la condición de incubación sobre la expresión de marcadores de inflamación en hígado y bazo.
3. Evaluar el efecto materno y de la condición de incubación sobre el éxito de eclosión y emergencia.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Santuario Playa La Escobilla ($15^{\circ}43'47''$ N $96^{\circ}44' 23''$ W), en el municipio Santa María Tonameca, Oaxaca de Juárez, México (Figura 1). La colecta se realizó con la colaboración de la cooperativa local del Centro Ecoturístico La Escobilla. Se seleccionaron 20 hembras anidantes durante los días 24 y 26 de febrero, 1 y 2 de marzo de 2023, bajo el número de licencia SEMARNAT: SGPA/DGVS/09122/21 y de acuerdo a la regulación mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010; NOM-162-SEMARNAT-2012). Los sitios de incubación (Sin-sombra y Sombra) fueron construidos por el personal del campamento uno al lado de otro con las mismas características: separación entre nidos (80 cm) y riego previo a la reubicación (15 días antes). La única diferencia entre los viveros fue la presencia de malla sombra (50%).



Figura 1. Localización del sitio de muestreo en Playa La Escobilla en el municipio de Santa María Tonameca, Oaxaca, México.

Evaluación materna

El único criterio para la elección de las hembras fue la observación del inicio de la oviposición. Se realizó una evaluación visual para identificar lesiones externas y parásitos, y una vez que la hembra inició la fase de trance se midió la longitud recta (LRC) y el ancho recto del caparazón (ARC) desde el escudo nucal hasta el supracaudal usando un calibre (Titanium, max = 1 m, d = 0.02 mm). Al final de la fase de trance se tomó una muestra de 5 ml de sangre del seno venoso cervical, la cual se conservó en tubos de heparina de litio en una hielera con refrigerante hasta su procesamiento en el campamento. Al término de la oviposición se registró la masa corporal de la hembra con una báscula romana (Trupper, max = 50kg, d= 0.5 kg), y se calculó el índice corporal con la fórmula $\frac{Masa (kg)}{LRC (cm)^3} * 10000$ (Espinoza-Romo *et al.*, 2018).

Las muestras de sangre fueron procesadas dentro de las 5 horas posteriores a su colecta y empleadas para cuantificar: microhematocrito, sólidos totales, perfil leucocitario y química sanguínea (n=20). Después de homogeneizar la muestra de sangre total, se tomó una fracción con un capilar heparinizado, el cual fue sellado con fuego, centrifugado 10 min a 4,000 rpm y usado para medir el microhematocrito. El plasma fue recuperado y utilizado para medir los sólidos totales en un refractómetro manual. Adicionalmente, una muestra de sangre fue usada para realizar un frotis sanguíneo, se dejó secar al aire, se tiñó con colorante Wright y se cuantificó en el laboratorio. Los leucocitos se estimaron contando las células blancas de 10 campos a una magnificación de 400x y el resultado se multiplicó por 1,500 para estimar la cantidad por microlitro (Sykes IV & Klaphake, 2008). El diferencial leucocitario se realizó a una magnificación de 1000x siguiendo las características morfológicas descritas para *Lepidochelys olivacea* (Zhang *et al.*, 2011; María *et al.*, 2012). El resto de la muestra sanguínea se centrifugó durante 10 min a 4,000 rpm, el plasma fue transferido a un tubo de microcentrífuga y se mantuvo en refrigeración para realizar una química seca dentro de las 24 horas posteriores a la toma de la muestra, con el equipo CeleCare V5 (Mnchip, 41116105) en la Universidad del Mar campus Puerto Escondido. Los analitos medidos en la química sanguínea fueron albúmina, proteínas totales, globulinas, el ratio albúmina/globulina, calcio, glucosa, nitrógeno ureico, fósforo, amilasa, colesterol, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, creatinina y creatinina kinasa.

Reubicación de nidos y registro de temperatura

La construcción de los nidos *ex situ* y la reubicación de los huevos se llevó a cabo por la misma persona. Los huevos fueron retirados inmediatamente después de ser ovipositados, y colocados alternadamente en dos bolsas de algodón por nido para su transporte. El número de huevos por madre fue registrado y considerado como inversión reproductiva. Todos los huevos fueron reubicados dentro de los 100 minutos posteriores al inicio de la oviposición. Se reubicó la mitad de cada nidada en nidos Sin-sombra (n=20) y la otra mitad en nidos con Sombra (n=20. Figura 2). Los nidos fueron identificados con estacas de madera no invasiva con el número de madre, fecha, hora de colecta, cantidad de huevos sembrados y número de sensor. Se registró la temperatura de 12 nidos (Sin-sombra, n=7 y Sombra, n=5) con sensores Hobo®. Los sensores se colocaron en los nidos procedentes de la misma madre a la mitad de la nidada, aproximadamente. La temperatura de incubación por cada sensor se registró tomando en cuenta la fecha y la hora de reubicación, así como la fecha y hora de inicio de la emergencia para obtener tanto los días exactos de reubicación-emergencia, como las temperaturas de cada hora en ese intervalo. Las lecturas de los sensores fueron ingresadas a una tabla dinámica (Abreu-Grogois *et al.*, en preparación) en la que se omitieron las primeras tres horas registradas. Se calcularon los días de incubación, los días por tercio de incubación, las temperaturas máximas, mínimas, promedios de temperatura por tercios y promedio general de temperatura.

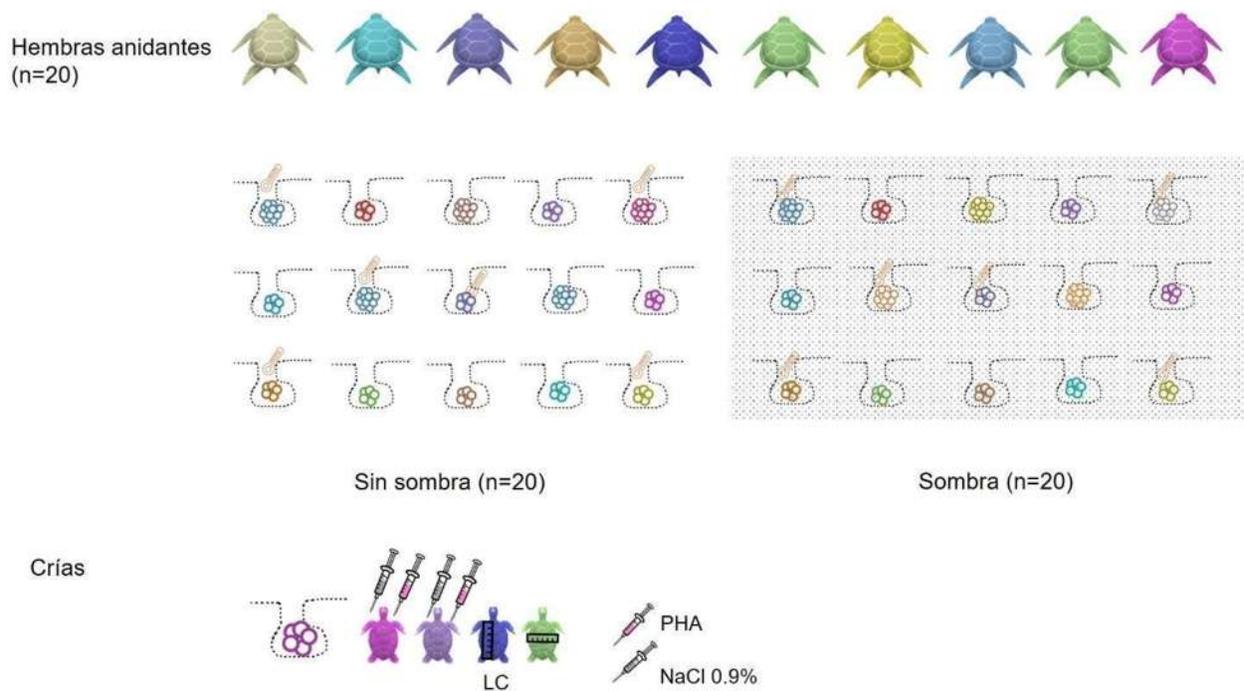


Figura 2. Diseño experimental. Se registraron parámetros fisiológicos (masa y longitud corporal y sanguíneos) de hembras anidantes (n=20). Las nidadas de cada hembra fueron divididas y sembradas en nidos Sin-sombra (n=20) y nidos Sombra (n=20), y se registró la temperatura de nidos seleccionados. Adicionalmente, se registraron parámetros fisiológicos de las crías (masa y talla corporal) provenientes de cada condición, así como su respuesta inflamatoria (n=20). Un individuo de cada nido fue sexado (n=10).

Colecta de crías

Una semana previa a la fecha predicha de emergencia se colocaron cercos de malla criba alrededor de los nidos, y desde un día antes se monitorearon cada hora hasta la emergencia y se registró la fecha y hora de inicio. Se colectaron diferentes crías de ambas condiciones de incubación para registrar: 1) parámetros de condición fisiológica (masa y longitud corporal), 2) respuesta inflamatoria (Sin sombra, n=20 y Sombra, n=20) y 3) expresión de genes inflamatorios y sexo (Sin sombra, n=10 y Sombra, n=10). Para evaluar la condición fisiológica se registró la masa corporal (OHAUS™ Scout Pro Sp 602, Max 600 g, 142 d=0.01 g), la LRC y el ARC (Mitutoyo™, Max 200 mm, d=0.03 mm). Una cría proveniente de los nidos con sensor de temperatura y de ocho nidos sin sensor (de

las mismas madres) fue sometida a eutanasia por decapitación inmediatamente después de realizar las mediciones correspondientes (Robledo-Avila *et al.*, 2022). Se colectó una muestra de sangre troncal, la cual fue centrifugada durante 10 min a 4,000 rpm para separar el suero, que fue preservado en nitrógeno líquido para análisis posteriores. Se disecaron el bazo y una porción de hígado (latero-ventral del lóbulo derecho), los cuales fueron preservados en RNAlater (Invitrogen®) para análisis de expresión génica. Adicionalmente, el complejo gónada-mesonefros fue preservado en formalina al 10% y procesado mediante técnicas histológicas de rutina para identificar el sexo de las crías (Herrera-Vargas *et al.*, 2017).

Reto inflamatorio

Para el reto inflamatorio se retuvieron dos crías por nido, las cuales fueron transportadas a una habitación sin luz inmediatamente después del registro de sus medidas corporales. Las crías se mantuvieron en tinas de plástico de acuerdo al nido de procedencia, fueron constantemente hidratadas con atomizador, y se identificaron con una marca temporal de pintura no tóxica. Se midió el grosor basal de las aletas craneales, entre la segunda y la tercera escama proximal (en su cara medial, a la altura de radio-ulna, tomando como referencia anatómica el pisiforme. Figura 3). Se inocularon 30 μ l de NaCl (0.9%) en la aleta izquierda y 30 μ l de PHA (1.78 mg/ml, en buffer de fosfatos 0.1M, Sigma-Aldrich) en la aleta derecha previa antisepsia con alcohol al 70%. El grosor de cada aleta fue medido a partir de las 8 horas post-inoculación y cada 4 horas durante 24 horas, y el índice inflamatorio fue calculado para cada medición con respecto a la medida basal con la fórmula: inflamación-basal/basal. Las crías fueron liberadas al finalizar las 24 horas de monitoreo.



Figura 3. Sitio de inoculación en las crías. La flecha izquierda señala el sitio de inoculación de NaCl, mientras la flecha en la aleta derecha señala el sitio de inoculación de fitohemaglutinina (PHA).

Expresión de genes inflamatorios de hígado y bazo

El bazo y una porción del lóbulo derecho del hígado de las crías se mantuvieron en RNAlater a -70°C (Sin-sombra $n=10$, Sombra $n=10$) hasta su procesamiento en el laboratorio. Se llevó a cabo la purificación de ARN con TRIzol™ Reagent de Invitrogen como lo indica el fabricante. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con 100 ng/ μl de ARN total mediante el iScript™ cDNA Synthesis Kit de BioRad como lo indica el fabricante. Las secuencias genéticas de interés fueron sintetizadas por T4Oligo (Tabla 1). La cuantificación de la expresión fue realizada mediante PCR RT con iTaq Universal SYBR Green® Supermix en el Termociclador BioRad CX2000 empleando 250 ng/ μl de cDNA para todas las reacciones. La pureza del ARN y cDNA se evaluó con espectrofotómetro Thermo Scientific™, NanoDrop™.

Tabla 1. Secuencias de cebadores y temperaturas melting (T_m).

Gen	Secuencia del cebador	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
<i>r18S</i> ^a	Forward GCTAATACATGCCGACGAG	60
	Reverse GGCCCGAGGTTATCTAGAG	
<i>hsf1</i> ^b	Forward GACAGCGGTTTCAGCACATTC	60
	Reverse AGTTGGCTGAAGAATCCGGG	
<i>hsp70</i> ^a	Forward TCTCCGTACAGCTTGTGAAC	60

	Reverse CCACGGAACAGATCAGC	
<i>hsp90</i> ^a	Forward GGATACTGGCATAGGGATG	57
	Reverse CAACACCAAACCTGACCAATC	
<i>tlr4</i> ^c	Forward TCACTTATGGTTCTCTCCACCG	57.5
	Reverse GGGAAGCTCCAGAGAGGTTCAA	
<i>rac1</i> ^d	Forward TTACACAGCGAGGCCTCAAG	60
	Reverse CCTTGTTCCGAGCAAAGCAC	
<i>pi3k</i> ^d	Forward AGCGAGAGCTGAGGATCTTCTTT	60
	Reverse CATGCCAAACCTTCATTGCTTCC	
<i>nfkb</i> ^d	Forward CGCGTGAGGCTCTTAAAATGG	60
	Reverse TGGTCCATCTGTTCGTAGTGG	
<i>il6</i> ^d	Forward CAGTGATCATGCCAGACCCA	60
	Reverse TCGAACAGCCCTCACAGTTT	
<i>tnfa</i> ^d	Forward TGAGCACCGAAAGTCTGGTC	60
	Reverse TCTGAAATGCAGCAGAGCGA	

^a Tedeshi *et al.* (2015); número de acceso del gen: ^b PRJNA675851, ^c PRJNA11872; ^d Cocci *et al.* (2022).

Parámetros de supervivencia

Una vez transcurridas 72 horas después de la emergencia, los nidos fueron excavados para recuperar los sensores de temperatura, cuantificar las crías no emergidas y los huevos no eclosionados. Los porcentajes de eclosión y de emergencia se calcularon con las siguientes fórmulas: Porcentaje de eclosión= número de huevos-número de huevos no eclosionados/ número de huevos incubados*100. Porcentaje emergencia= número de huevos –(números no eclosionados+crías vivas dentro del nido+crías muertas dentro del nido) /número de huevos incubados*100, como ha sido previamente descrito (Robledo-Avila *et al.*, 2022).

Análisis estadísticos

La normalidad e igualdad de la varianza se evaluó con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Se comparó la temperatura promedio y la duración de la incubación entre las condiciones de incubación (Sin-sombra vs. Sombra) con la prueba *t* de Welch. Se evaluó el efecto de los indicadores de condición corporal, hemograma y analitos bioquímicos de las hembras anidantes sobre la condición corporal de las crías, el índice inflamatorio (a las 8 y 12 horas) y la expresión de genes inflamatorios en bazo e hígado con modelos generalizados mixtos usando como factor interdependiente entre condiciones de incubación la identificación materna y en todos los modelos una variable materna en interacción con la condición de incubación. Se seleccionó el modelo con el criterio de información de Akaike condicional (cAIC) más bajo. Para comparar la expresión de genes inflamatorios en bazo e hígado se calculó el delta CT, en el que un valor menor es igual a mayor expresión. Los indicadores de éxito de supervivencia (porcentajes de eclosión y emergencia) se compararon con la prueba de Wilcoxon.

Los análisis se realizaron con R (R Core Team, 2020). Se utilizaron los siguientes paquetes: readxl (Wickham & Bryan, 2019), lme4 (Bates *et al.*, 2015), lmerTest (Kuznetsova *et al.*, 2017), cAIC (Safken *et al.*, 2018), performance (Lüdecke *et al.*, 2021), DHARMA (Hartig, 2022) y sjPlot (Lüdecke, 2023) y ggplot2 (Wickham, 2016).

VI. RESULTADOS

Parámetros de condición materna

En las hembras anidantes no se encontraron lesiones evidentes, se presentaron alertas y responsivas a estímulos externos. De las 20 hembras evaluadas, cuatro presentaron epibiontes (20%) en baja cantidad (1-3 epibiontes) en el caparazón y cuello. Los resultados de las variables de talla corporal, número de huevos, microhematocrito, proteínas totales, perfil leucocitario y química sanguínea se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros corporales, número de huevos ovipositados y hematológicos medidos en sangre de las hembras anidantes.

Variables corporales	Promedio±EE	Rango
Masa (kg)	29.96±1.38	20-46
LRC (cm)	57.30±0.8	47-61.5
ARC (cm)	53.4±0.9	43-64.5
ICC	1.64±0.12	1.12-3.76
Número de huevos	91 ± 4	50-117
Analito	Promedio±EE	Rango
Hematocrito (%)	26.98±0.99	16-33
Leucocitos estimados/μl	7710.93±607.41	6187-12562
Heterófilos (%)	47.8±3.65	34-76
Linfocitos (%)	13.1±2.6	02-47
Monocitos (%)	8.7±0.90	02-15
Eosinófilos (%)	23.7±3.17	01-43
Basófilos (%)	0.4±0.23	1-2
Albúmina (g/dL)	1.66±0.05	1.3-2
Proteínas totales (g/dL)	3.65±0.15	2-4.7
Globulinas (g/dL)	1.99±0.12	1.1-2.6
Albúmina/Globulinas	0.91±0.06	0.5-1.9
Glucosa (mg/dL)	99.2±3.64	65-135
Urea nitrogenada (mg/dL)	11.54±0.9	4.16-20.3
Creatinina (mg/dL)	1±0.08	0.4-1.51
Urea nitrogenada/creatina	14.9±2.43	04-39
Colesterol (mg/dL)	198.75±11.45	116-294

Bilirrubina total (mg/dL)	0.3±0.02	0.14-0.59
Fosfatasa alcalina (U/L)	22.6±0.99	12-30
Amilasa (U/L)	134.9±9.2	81-211
Alanina aminotransferasa (U/L)	3	-
Creatina quinasa (U/L)	652.2±161.78	160-2323
Calcio (mg/dL)	18.74±0.12	17.1-19.4
Fósforo (mg/dL)	9.99±0.27	8.2-12.5

LRC, Longitud Recta del Caparazón; ARC, Ancho Recto del Caparazón; ICC, Índice de Condición Corporal.

Registro de temperatura al interior de los nidos seleccionados, duración de la incubación y sexo de las crías

La temperatura de incubación fue mayor en los nidos Sin-sombra en comparación con los Sombra tanto para la temperatura promedio, como para aquéllas temperaturas del primer, segundo y tercer tercio de incubación. La duración de la incubación, el éxito de eclosión y emergencia fueron menores en la condición Sin-sombra. La condición de incubación Sombra sesgó la proporción sexual hacia machos, mientras sólo se identificaron hembras en los nidos Sin sombra. La masa y longitud corporal de las crías fue menor en la condición Sin-sombra vs. Sombra (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de modelos t de Welch y Wilcoxon que muestran la comparación de diversos parámetros entre las condiciones de incubación Sin-sombra vs. Sombra.

Parámetro	Condición de incubación		Valor estadístico (g.l.)	p
	Sin sombra	Sombra		
Temperatura (°C)	Promedio ± EE	Promedio ± EE		
Promedio	33.7 ± 0.48	30.8 ± 0.87	t _(5.7) =6.7	≤ 0.001
1er tercio	32.5 ± 0.72	29.8 ± 0.52	t _(9.9) =7.4	≤ 0.001
2do tercio	33.7 ± 0.5	30.8 ± 0.59	t _(7.9) =8.8	≤ 0.001
3er tercio	34.7 ± 0.41	32 ± 0.64	t _(6.3) =8.2	≤ 0.001
Días de incubación	Mediana	Mediana		
	46	50	W=461.5	≤ 0.001
Éxito de eclosión (%)	Mediana	Mediana		
	60.6	87.8	W=406.5	≤ 0.01
Éxito de emergencia (%)	Mediana	Mediana		
	34.5	83.33	W=436	≤ 0.001
Sexo (%)	Hembras (100)	Machos (100)		
Masa corporal (g)	Promedio ± EE	Promedio ± EE		
	15.90±0.17	16.98±0.14	t _(110.74) =-4.84	≤ 0.001
Longitud corporal (mm)	mean ± SEM	mean ± SEM		
	41.35±0.20	42.87±0.17	t _(112.48) =-5.77	≤ 0.001

g.l., grados de Libertad calculados por ecuación Welch–Satterthwaite; t, indicador t-Student; W, indicador Wilcoxon test; p, p-value. Los valores en negrita denotan efectos significativos en $p \leq 0.05$.

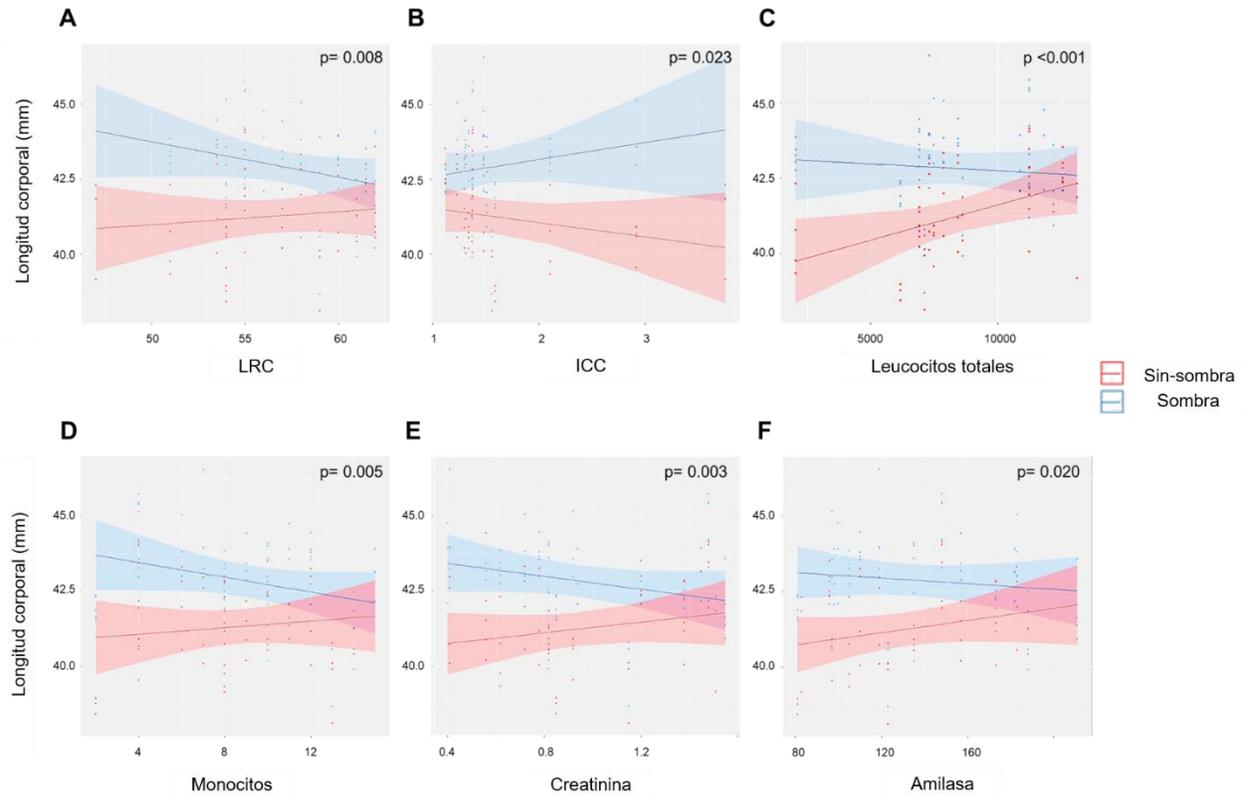
Talla corporal

Los leucocitos, creatinina, monocitos, longitud corporal, creatinina kinasa, relación albúmina-globulina y fósforo plasmático de las hembras anidantes interactúan con la condición de incubación para determinar la longitud corporal de las crías (Tabla 4 y Gráfica 1).

Tabla 4. Resumen de modelos lineales mixtos generalizados que muestran la interacción entre las variables maternas con la condición de incubación que explican la longitud corporal de las crías.

	β	t (d.f.)	p	R2
Longitud corporal (mm)				
Intercepto	38.83	10.01 _(24.04)	<0.001	0.26
LRC	0.04	0.63 _(24.41)	0.532	
Condición de incubación	10.83	3.19 _(119.07)	<0.01	
LRC: Condición de incubación	-0.16	-2.7 _(119.09)	<0.01	
Intercepto	42.02	55.11 _(21.84)	<0.001	0.26
ICC	-0.48	-1.12 _(21.21)	0.274	
Condición de incubación	0.02	0.02 _(116.78)	0.983	
ICC: Condición de incubación	1.04	2.33 _(118.27)	0.022	
Intercepto	41.26	150.35 _(23.61)	<0.001	0.28
Leucocitos totales	0.66	2.4 _(23.30)	0.025	
Condición de incubación	1.55	7.6 _(114.39)	<0.001	
Leucocitos totales: Condición de incubación	-0.78	-3.8 _(117.01)	<0.001	
Intercepto	40.86	53.06 _(22.57)	<0.001	0.25
Monocitos	0.06	0.66 _(26.82)	0.514	
Condición de incubación	3.10	5.70 _(109.52)	<0.001	
Monocitos: Condición de incubación	-0.18	-2.88 _(112.41)	<0.01	
Intercepto	40.4	50.11 _(26.89)	<0.001	0.26
Creatinina	0.89	1.13 _(28.56)	0.270	
Condición de incubación	3.45	5.54 _(116.81)	<0.001	
Creatinina: Condición de incubación	-1.96	-3.9 _(119.66)	<0.01	
Intercepto	39.93	39.00 _(29.98)	<0.001	0.28
Amilasa	0.01	1.34 _(32.02)	<0.001	
Condición de incubación	3.59	4.26 _(118.43)	0.189	
Amilasa: Condición de incubación	-0.01	-2.39 _(118.36)	0.019	
Masa corporal (g)				
Intercepto	15.81	67.15 _(25.98)	<0.001	0.18
Condición de incubación	1.18	6.84 _(114.19)	<0.001	

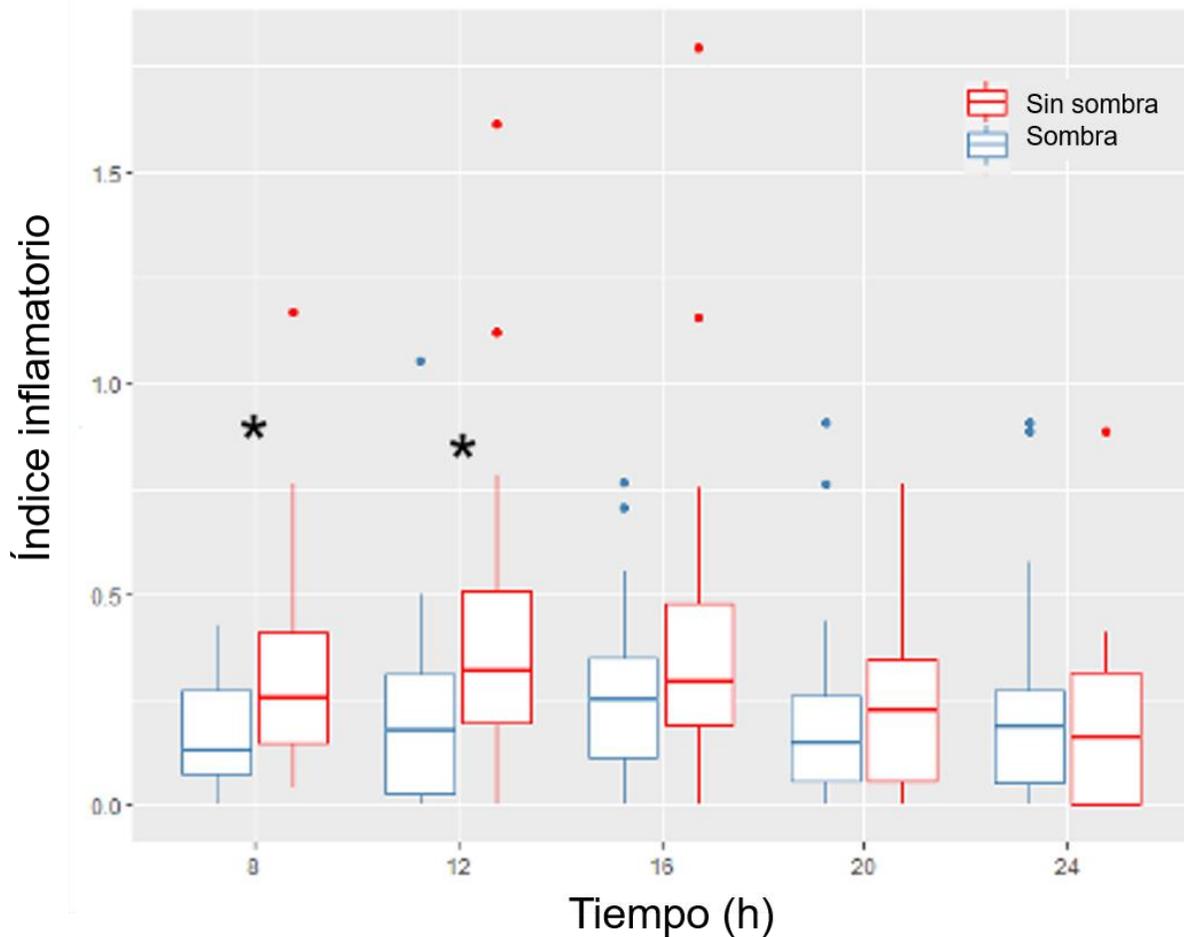
β , coeficiente de regresión, g.l., grados de libertad calculados por ecuación Welch–Satterthwaite; t, indicador t-Student; p, p-value; R2, coeficiente de determinación marginal o ajustado. Los valores en negrita denotan efectos significativos en $p \leq 0.05$.



Gráfica 1. Figuras que muestran la longitud corporal de las crías en función de la interacción entre variables corporales y hematológicas maternas: A) Longitud corporal, LCR; B) Índice de condición corporal, ICC; C) Leucocitos totales, D) Monocitos, E) Creatinina, F) Amilasa con el ambiente incubatorio Sin-sombra (rojo), Sombra (azul). Las áreas sombreadas muestran los intervalos de los coeficientes de regresión, $p \leq 0.05$ indica pendientes significativamente diferentes.

Reto inflamatorio

El índice inflamatorio fue mayor en las crías provenientes de la condición de incubación Sin-sombra tanto a las 8 (0.38 ± 0.05 , 0.22 ± 0.05 Promedio \pm EE, $W=805$, $p=0.003$) como a las 12 horas post inoculación (0.30 ± 0.03 vs 0.16 ± 0.02 Prom. \pm EE, $t_{(64.87)}=-3.4$, $p=0.001$, Gráfica 2). Los modelos lineales mixtos con las variables maternas no cumplieron los supuestos estadísticos para el índice inflamatorio, por lo que únicamente se comparó la condición de incubación.



Gráfica 2. La figura muestra la distribución del índice de inflamación de las dos condiciones de incubación, la línea horizontal en cada caja muestra el promedio. El índice de inflamación fue mayor en las crías emergidas de la condición Sin-sombra (rojo) vs. Sombra (azul) a las 8 (0.38 ± 0.05 , 0.22 ± 0.05 Promedio \pm EE, $W=805$, $p=0.003$) y 12 (0.30 ± 0.03 vs 0.16 ± 0.02 Prom. \pm EE, $t_{(64.87)}=-3.4$, $p=0.001$) horas post-inoculación. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas a $p \leq 0.05$

Expresión de genes inflamatorios en hígado y bazo

Los leucocitos estimados de las hembras anidantes tanto en interacción con el ambiente como en un solo término explican la variación de la expresión de *hsp90* en el bazo, los linfocitos en interacción con el ambiente explican la expresión de *hsp70*, *rac1* en el bazo y *nfkB* en el hígado. La albúmina en interacción con el ambiente incubatorio explica la

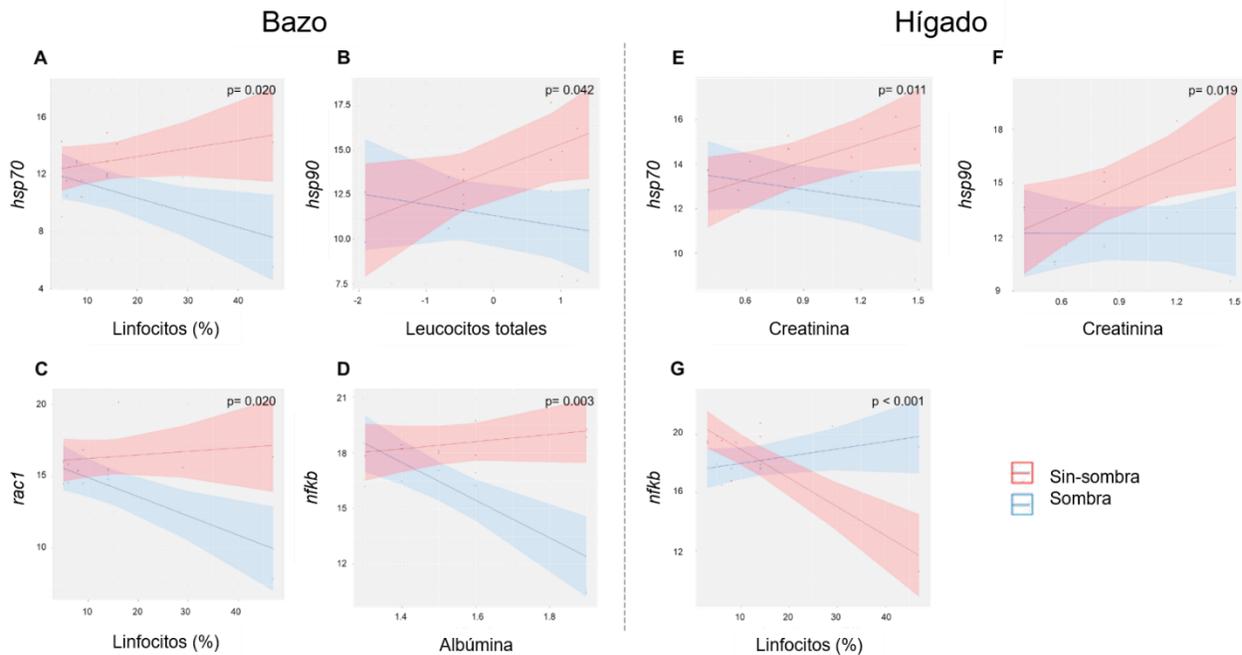
expresión de *nfkB* en el bazo. En el hígado la interacción de la creatinina con la condición Sombra explica la expresión de *hsp70* y *90* (Gráfica 3). Los modelos lineales generalizados mixtos se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de los modelos lineales generalizados mixtos que muestran la interacción de las variables maternas con la condición de incubación para explicar la variación en la expresión de genes inflamatorios en el bazo e hígado de las crías.

	β	t (g.l.)	p	R2
Bazo				
<i>hsp70</i> (lineal mixto)				0.48
Intercepto	12.15	14.15 _(14.00)	<0.001	
Linfocitos (%)	0.06	1.31 _(11.94)	0.215	
Sombra	0.24	0.22 _(10.23)	0.832	
Linfocitos (%): Sombra	-0.16	-2.81 _(10.29)	0.018	
<i>hsp90</i> (lineal mixto)				
Intercepto	13.86	19.99 _(10.69)	<0.001	0.43
Leucocitos estimados	1.46	2.19 _(13.63)	0.047	
Sombra	-2.52	-2.81 _(10.36)	0.018	
Leucocitos estimados: Sombra	-2.07	-2.35 _(10.37)	0.040	
<i>rac1</i> (lineal mixto)				
Intercepto	16.00	19.28 _(14.00)	<0.001	0.54
Linfocitos (%)	0.02	0.58 _(12.31)	0.570	
Sombra	0.24	0.22 _(10.54)	0.830	
Linfocitos (%): Sombra	-0.16	-2.83 _(10.61)	0.017	
<i>pi3k</i> (lineal)				
Intercepto	19.40	4.78 _(4.06)	<0.001	0.37
Glucosa	-0.001	-0.03 _(0.04)	0.977	
Sombra	9.96	1.74 _(5.73)	0.104	
Glucosa: Sombra	-0.11	-2.03 _(0.06)	<i>0.062</i>	
<i>nfkB</i> (lineal mixto)				
Intercepto	15.54	5.15 _(11.24)	<0.001	0.68
Albúmina	1.91	1.01 _(11.14)	0.334	
Sombra	16.16	3.61 _(9.45)	0.005	
Albúmina: Sombra	-12.07	-4.19 _(9.56)	0.002	
Hígado				
<i>hsp70</i> (lineal mixto)				0.36
Intercepto	11.65	10.56 _(15.99)	<0.001	
Creatinina	2.71	2.51 _(15.06)	0.024	
Sombra	2.34	1.84 _(9.74)	0.097	
Creatinina: Sombra	-3.97	-3.10 _(9.75)	0.012	
<i>hsp90</i> (lineal mixto)				
Intercepto	10.58	6.07 _(8.91)	<0.001	0.46
Creatinina	4.61	2.61 _(10.10)	0.026	

Sombra	1.63	1.12(7.20)	0.300	
Creatinina: Sombra	-4.63	-3.04(7.49)	0.017	
<i>nfkB</i> (lineal mixto)				0.65
Intercepto	20.92	31.78(13.91)	<0.001	
Linfocitos (%)	-0.20	-5.51(13.00)	<0.001	
Sombra	-3.39	-3.71(10.06)	0.004	
Linfocitos (%): Sombra	0.25	5.20(10.22)	<0.001	

β , coeficiente de regresión; g.l., grados de Libertad calculados por ecuación Welch–Satterthwaite; t, indicador t-Student; p, p-value; R², coeficiente de determinación marginal o ajustado. Los valores en negrita denotan efectos significativos a $p \leq 0.05$.



Gráfica 3. Figuras que muestran la expresión de mRNA en bazo (A-D) e hígado (E-G) de las crías en función de la interacción entre variables hematológicas y bioquímicas maternas con el ambiente incubatorio, Sin-sombra (rojo), Sombra (azul). A) *hsp70* vs. Linfocitos; B) *hsp90* vs. Leucocitos totales ; C) *rac1* vs. Linfocitos, D) *nfkB* vs. Albúmina; en el hígado E) *hsp70* vs. Creatinina, F) *hsp90* vs. Creatinina y G) *nfkB* vs. Linfocitos. Lo valores más altos representan menor expresión. Las áreas sombreadas muestran los intervalos de los coeficientes de regresión, $p \leq 0.05$ indica pendientes significativamente diferentes.

VII. DISCUSIÓN

Este estudio evaluó el efecto de los parámetros bioquímicos y la condición corporal de las hembras anidantes y su interacción con la condición de incubación Sin-sombra vs. Sombra sobre las variables corporales, intensidad inflamatoria y expresión de genes inflamatorios en bazo e hígado de las crías a la emergencia. Las variables corporales (LRC, ARC, Masa, ICC) y hematológicas (hemograma y química sanguínea) de las hembras anidantes estuvieron dentro de los parámetros reportados para la especie (Brenes *et al.*, 2013). Las condiciones de incubación Sin-sombra vs. Sombra generaron temperaturas de incubación contrastantes y todas las variables de respuesta de las crías se vieron influenciadas por el ambiente incubatorio; las crías emergidas de Sin-sombra fueron hembras y de Sombra machos. La longitud corporal y algunas variables hematológicas en su mayoría en interacción con el ambiente incubatorio influenciaron la configuración corporal e inmunitaria de las crías, pero no la intensidad inflamatoria. El efecto del sexo sobre las variables de respuesta como la inflamación y la expresión de genes inflamatorios de las crías tendrán que ser dilucidados en futuras investigaciones.

La respuesta inflamatoria a PHA y el sexo fueron explicados por la condición de incubación

De acuerdo con estudios previos en la misma playa (Robledo-Avila *et al.*, 2022), la incubación en viveros con Sombra redujo las temperaturas dentro de los nidos lo suficiente como para aumentar la duración de la incubación y sesgar completamente el sexo de las crías. Además, la condición Sombra aumentó los parámetros de supervivencia (éxito de la eclosión y la emergencia) como ha sido reportado anteriormente (Booth *et al.*, 2015; Robledo-Avila *et al.*, 2022). Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la respuesta inflamatoria con el desafío de PHA fue menor en las crías incubadas en la condición Sombra en comparación con las crías emergidas en la condición Sin-sombra. Las temperaturas de incubación más altas se han asociado con la activación de vías metabólicas, inflamatorias y prooxidantes (Teidel *et al.*, 2016). Específicamente, las temperaturas de incubación más cálidas en tortugas marinas recién emergidas se han asociado con un aumento de los indicadores relacionados con la inflamación (Fleming *et al.*, 2020), así como con una mayor actividad de prooxidantes (es

decir, peróxido de hidrógeno) y antioxidantes (es decir, capacidad antioxidante total. Robledo-Ávila *et al.*, 2023). Por lo tanto, es probable que las temperaturas más cálidas promuevan una respuesta inflamatoria más intensa debido al aumento del metabolismo y la activación inmunitaria. Dado que los nidos sombreados sesgan la determinación del sexo hacia los machos, mientras que los nidos sin sombra promueven el desarrollo de las hembras, es imposible separar la respuesta inflamatoria del sexo de las crías. Sin embargo, además de identificar si se trata o no de un efecto ligado al sexo, cabe resaltar que es un efecto directo de la condición de incubación. Estudios futuros deberían determinar si la respuesta inflamatoria reducida en los machos se asocia con una respuesta inmunitaria más débil o solo con una respuesta local reducida a un mitógeno, como se sugirió anteriormente (Sánchez & Refsnider, 2017). Así mismo, se deberá explorar la influencia de otras variables maternas como el estado inmunitario de las hembras anidantes, ya que nuestro estudio no descarta la participación materna con las variables evaluadas.

Algunos estudios ecológicos sugieren que el objetivo de modular la temperatura en incubaciones *ex-situ* debería considerar incubar a temperaturas pivotales, es decir que se produzcan el 50 % de machos y hembras (DeGregorio & Southwood, 2011). Para lo anterior debería considerarse hacer estudios diagnósticos de diferenciación sexual y resistencia térmica, sobre todo en playas con alta producción de crías ya que se ha sugerido son diferentes umbrales térmicos entre poblaciones (DeGregorio & Southwood, 2011; Tanabe *et al.*, 2020;).

La longitud corporal materna y el ambiente de incubación interactúan para determinar la configuración corporal e inmunitaria de las crías

Las crías incubadas en la condición Sombra tuvieron una mayor longitud corporal en comparación con las incubadas en Sin-sombra. La longitud corporal de las hembras anidantes, el índice de condición corporal, los leucocitos totales, el porcentaje de monocitos, la creatinina, y la amilasa en interacción con el ambiente incubatorio se asociaron con la longitud corporal de las crías. Un efecto contrario se observó entre las condiciones de incubación, que a excepción del ICC tienen relación negativa en la condición de incubación Sombra. La cantidad de leucocitos estimados tanto en

interacción con la condición de incubación como sin interacción, se asoció con la longitud corporal de las crías. Estos resultados resaltan la importancia del estado inmunitario de la hembra anidante sobre el fenotipo de su descendencia, como ha sido previamente sugerido (Brown & Shine, 2016; Virgin *et al.*, 2022).

La expresión basal de genes de inflamación (*tlr4*, *rac1*, *pi3k*, *nfkb*, *il6* y *tnfa*) y estrés térmico (*hsf1*, *hsp70* and *hsp90*) a la emergencia del nido tanto en el bazo como en el hígado fue mayor en las crías incubadas en la condición de Sombra. Las variables maternas que en interacción con la condición de incubación se relacionaron con la expresión de estos genes fueron los leucocitos estimados, el porcentaje de linfocitos, la concentración de albúmina y creatinina. En todos los casos las variables maternas interactuaron diferencialmente para explicar la expresión de mRNA. Aunque lo anterior pareciera contradictorio con la respuesta inflamatoria frente a PHA que fue mayor en la condición Sin-sombra, la determinación de la expresión de mRNA fue en condiciones basales, es decir previo al reto. Se ha sugerido que las vías inflamatorias desencadenadas por *rac1* y *nfkb* están involucradas en la defensa antioxidante, por lo que una mayor expresión podría reflejar esta condición en las crías incubadas en Sombra (Cuadrado *et al.*, 2014).

Los resultados indican que las interacciones entre efectos maternos con la condición de incubación Sombra generan tanto menor longitud corporal como una mayor expresión de indicadores de inflamación, lo que resalta la fuerte presión ambiental generando mayor variación fenotípica en la condición con menor temperatura de incubación. Dado que los efectos maternos son sensibles a la variación ambiental, los efectos maternos anticipatorios podrían promover fenotipos óptimos cuando el ambiente coincide con el predicho por la madre (es decir, condición Sin-sombra). Sin embargo, cuando la progenie está expuesta a ambientes no previstos por la hembra anidadora (es decir, condición Sombra), los efectos maternos pueden mediar en las compensaciones entre los reguladores fisiológicos que dan como resultado fenotipos divergentes (Hibshman *et al.*, 2018; Vrtílek *et al.*, 2021). Hasta donde sabemos, esta variación dependiente del medio ambiente en los efectos maternos representa una forma de interacción materno-ambiental que no ha sido estudiada en las tortugas marinas. Nuevamente, estos efectos

maternos modulados por el medio ambiente podrían estar asociados con el sexo de las crías. En cualquier caso, es una forma novedosa de entender las relaciones madre-ambiente que determinan el desarrollo óptimo de la descendencia.

Parámetros de supervivencia

El porcentaje de eclosión y emergencia fue mayor en la condición Sombra vs Sin-sombra, lo cual se ha asociado mayor éxito de supervivencia a menores temperaturas de incubación (Tedeschi *et al.*, 2016, Robledo-Avila *et al.*, 2022). Por el contrario, se ha documentado expresión de genes asociados al desarrollo embrionario a la baja cuando los embriones experimentan temperaturas elevadas por encima del límite térmico (Bentley *et al.*, 2017). Aunque en este estudio los modelos lineales mixtos entre la condición de incubación y las variables maternas no cumplieron con los supuestos estadísticos no se descarta la influencia materna en el éxito de supervivencia como ha sido descrito en otras especies y se deberá seguir evaluando en futuras investigaciones (Perrault *et al.*, 2012).

VIII. CONCLUSIÓN

Este estudio evaluó el efecto de los indicadores maternos, así como el efecto de dos condiciones de incubación contrastantes y su interacción, sobre el tamaño corporal, la inflamación y la configuración inmunitaria en las crías de tortuga marina. El tamaño corporal y la expresión de ARNm fueron más altos en las crías incubadas en nidos sombreados, mientras que la respuesta inflamatoria a un desafío con PHA fue de menor intensidad. Los resultados muestran que los factores maternos y ambientales, y su interacción, determinan el tamaño corporal de las crías y la expresión de ARNm de genes relacionados con el estrés térmico y la inflamación, mientras que las condiciones de incubación explican la inflamación y el sexo. Juntos, los resultados sugieren que el tamaño del cuerpo de las crías y la configuración inmunitaria son el resultado de un efecto materno modulado por el medio ambiente que debe tenerse en cuenta al diseñar estrategias de conservación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu-Grobois, A. & Plotkin, P. (2008). *Lepidochelys olivacea* (Olive Ridley). <https://doi.org/10.2305>

Amaral, M.J., Bicho, R.C., Carretero, M.A. Sanchez-Hernandez, J.C., Faustino, A.M.R., Soares, A.M.V.M., & Mann, R.M. (2012). The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: Part 2 – Biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards. *Chemosphere*, 87(7), 765–774. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.01.048>

Anderson, E.T., Minter, L.J., Clarke, E.O., Mroch, R.M., Beasley, J.F., & Harms, C.A. (2011). The effects of feeding on hematological and plasma biochemical profiles in green (*Chelonia mydas*) and Kemp's Ridley (*Lepidochelys kempii*) Sea Turtles. *Veterinary Medicine International*, 890829, 1-7. <https://doi.org/10.4061/2011/890829>

Arzola-González, J.F. (2007). Moisture and temperature in hatching of olive turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz 1829). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 42(3), 377–383. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572007000300017>

Bentley, B.P., Haas, B.J., Tedeschi, J.N., & Berry, O. (2017). Loggerhead sea turtle embryos (*Caretta caretta*) regulate expression of stress response and developmental genes when exposed to a biologically realistic heat stress. *Molecular Ecology*, 26(11), 2978–2992. <https://doi.org/10.1111/mec.14087>

Bílková, B., Vinklerová, J., & Vinkler, M. (2015). The relationship between health and cell-mediated immunity measured in ecology: Phytohaemagglutinin skin-swelling test mirrors blood cellular composition. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323(10), 767–777. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1990>

Boehm, T., Hess, I., & Swann, J.B. (2012). Evolution of lymphoid tissues. *Trends in Immunology*, 33(6), 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.005>

Booth, D.T. (2018). Incubation temperature induced phenotypic plasticity in oviparous reptiles: Where to next?. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329(6–7), 343–350. <https://doi.org/10.1002/jez.2195>

Booth, D.T., Feeney, R., & Shibata, Y. (2012). Nest and maternal origin can influence morphology and locomotor performance of hatchling green turtles (*Chelonia mydas*) incubated in field nests. *Marine Biology*, 160(1), 127–137. <https://doi.org/10.1007/S00227-012-2070-Y>

Brenes-Chaves, L., Berrocal, A. Meneses, A.I., Jiménez Sánchez, C., & Orrego Vásquez, C.M. (2013). Study on the etiology of fibropapillomatosis of olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) nesting in the National Wildlife Refuge at Ostional, Guanacaste, Costa Rica. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 5, 119. <https://doi.org/10.15359/revmar.5.8>

Brown, G. P., & Shine, R. (2009). Beyond sizenumber trade-offs: clutch size as a maternal effect. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1520), 1097–1106. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2008.0247>

Brown, G. P., & Shine, R. (2016). Maternal body size influences offspring immune configuration in an oviparous snake. *Royal Society Open Science*, 3(3), 1-15. <https://doi.org/10.1098/RSOS.160041>

Camacho, M., Orós, J., Boada, L. D., Zaccaroni, A., Silvi, M., Formigaro, C., López, P., Zumbado, M., & Luzardo, O. P. (2013). Potential adverse effects of inorganic pollutants on clinical parameters of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): Results from a nesting colony from Cape Verde, West Africa. *Marine Environmental Research*, 92, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2013.08.002>

Castelli, S., De Falco, P., Ciccarone, F., Desideri, E., & Ciriolo, M. R. (2021). Lipid Catabolism and ROS in Cancer: A Bidirectional Liaison. *Cancers*, 13(21), 5484. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13215484>

Cuadrado, A., Martín-Moldes, Z., Ye, J., Lastres-Becker, I. (2014). Transcription factors NRF2 and NF- κ B are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation. *Journal of biological chemistry*, **289**,15244-58 <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540633>.

Dang, W., Zhang, W., & Du, W.G. (2015). Incubation temperature affects the immune function of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Scientific Reports* 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep10594>

DeGregorio, B., Southwood, W.A. (2011). Temperaturas de incubación y calentamiento metabólico de nidos de tortuga boba (*Caretta caretta*) reubicados e in situ en una colonia de grajos del norte. *Conservación y biología de quelonios*, 10 (1): 54–61. <https://doi.org/10.2744/CCB-0880.1>

Dennerly, P. A. (2010). Oxidative stress in development: Nature or nurture? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(7), 1147–1151. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.07.011>

Ensminger, D.C., Langkilde, T., Owen, D.A.S., MacLeod, K. J., & Sheriff, M. J. (2018). Maternal stress alters the phenotype of the mother, her eggs and her offspring in a wild-caught lizard. *Journal of Animal Ecology*, 87(6), 1685–1697. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12891>

Espinoza-Romo, B.A., Sainz-Hernández, J.C., Ley-Quiñónez, C.P., Hart, C.E., Leal-Moreno, R., Aguirre, A. A., & Zavala-Norzagaray, A. A. (2018). Blood biochemistry of olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) sea turtles foraging in northern Sinaloa, Mexico. *PLoS ONE*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0199825>

Finger, J. W., Adams, A. L., Thomson, P. C., Shilton, C. M., Brown, G. P., Moran, C., Miles, L. G., Glenn, T. C., & Isberg, S. R. (2013). Using phytohaemagglutinin to determine immune responsiveness in saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Australian Journal of Zoology*, 61(4), 301–311. <https://doi.org/10.1071/ZO13041>

Fleming, K.A., Perrault, J. R., Stacy, N. I., Coppentrath, C. M., & Gainsbury, A. M. (2020). Heat, health and hatchlings: Associations of in situ nest temperatures with morphological and physiological characteristics of loggerhead sea turtle hatchlings from Florida. *Conservation Physiology*, 8(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa046>

Freedberg, S., Greives, T., Ewert, M., Demas, G., Beecher, N., & Nelson, C. (2008). Incubation Environment Affects Immune System Development in a Turtle with

Environmental Sex Determination. *J Herpetol.*, 42(3), 536–541.
<https://doi.org/10.1670/07-133.1>

Gatto, C.R., & Reina, R.D. (2020). Sea turtle hatchling locomotor performance: incubation moisture effects, ontogeny and species-specific patterns. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 190(6), 779–793.
<https://doi.org/10.1007/S00360-020-01307-Z/METRICS>

Hart, C. E., Zavala-Norzagaray, A. A., Benítez-Luna, O., Plata-Rosas, L. J., Abreu-Grobois, F. A., & Ley-Quiñonez, C. P. (2016). Effects of incubation technique on proxies for olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) neonate fitness. *Amphibia Reptilia*, 37(4), 417–426. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003072>

Hasselquist, D., & Nilsson, J.Å. (2012). Physiological mechanisms mediating costs of immune responses: What can we learn from studies of birds?. *Animal Behaviour* 83, (6).
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.03.025>

Herrera-Vargas, Ma. A., Meléndez-Herrera, E., Gutiérrez-Ospina, G., Bucio-Piña, F. E., Báez-Saldaña, A., Siliceo-Cantero, H. H., & Fuentes-Farías, A. L. (2017). Hatchlings of the Marine Turtle *Lepidochelys olivacea* Display Signs of Prenatal Stress at Emergence after Being Incubated in Man-Made Nests: A Preliminary Report. *Frontiers in Marine Science*, 4, 1-9. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2017.00400>

Honarvar, S., Brodsky, M. C., Fitzgerald, D. B., Rosenthal, K. L., & Hearn, G. W. (2011). Changes in plasma chemistry and reproductive output of nesting leatherbacks. *Herpetologica*, 67(3), 222–235. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-10-00061.1>

Hudson, S.B., Kluever, B.M., Webb, A.C., & French, S.S. (2020). Steroid hormones, energetic state, and immunocompetence vary across reproductive contexts in a parthenogenetic lizard. *General and Comparative Endocrinology*, 288, 113372.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113372>

Jiang, Y.-J., Gao, J.-F., Lin, L.-H., Li, H., Meng, Q.-G., Qu, Y.-F., & Ji, X. (2022). Single-cell transcriptomes from turtle livers reveal sensitivity of hepatic immune cells to bacteria-infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 131, 847–854.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.10.033>

Jones, S. M. (2010). Hormonal Regulation of Ovarian Function in Reptiles. *Hormones and Reproduction of Vertebrates: Reptiles* 3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374930-7.10004-4>

Jualaong, S., Kanghae, H., Thongprajukaew, K., Saekhow, S., Amartiratana, N., & Sotong, P. (2021). Optimal Feeding Frequency for Captive Hawksbill Sea Turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Animals*, 11(5), 1252. <https://doi.org/10.3390/ANI11051252>

King, E., Hostnik, E.T., Junge, R., Adkesson, M.J., Newman, E. M., & Allender, M. C. (2020). Hepatic CT attenuation differs in three species of freshwater turtles and hepatic Hounsfield units increase with folliculogenesis in wild Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*). *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 61(2), 181–189. <https://doi.org/10.1111/vru.12827>

Kobayashi, S., Aokura, N., Fujimoto, R., Mori, K., Kumazawa, Y., Ando, Y., Matsuda, T., Nitto, H., Arai, K., Watanabe, G., & Saito, T. (2018). Incubation and water temperatures influence the performances of loggerhead sea turtle hatchlings during the dispersal phase. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30347-3>

Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., & Christensen, R.H.B. (2017). ImerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*, 82(13), 1–26. <https://doi.org/10.18637/JSS.V082.I13>

Lang, B. J., Guerrero, M. E., Prince, T. L., Okusha, Y., Bonorino, C., & Calderwood, S. K. (2021). The functions and regulation of heat shock proteins; key orchestrators of proteostasis and the heat shock response. *Archives of Toxicology*, 95(6), 1943–1970. <https://doi.org/10.1007/S00204-021-03070-8/FIGURES/6>

Lanz-Mendoza, H., & Contreras-Garduno, J. (2022). Innate immune memory in invertebrates: Concept and potential mechanisms. *Developmental & Comparative Immunology*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104285>

Le Gouvello, D. Z. M., Nel, R., & Cloete, A. E. (2020). The influence of individual size on clutch size and hatchling fitness traits in sea turtles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 527, 151372. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2020.151372>

Lorioux, S., Vaugoyeau, M., DeNardo, D. F., Clobert, J., Guillon, M., & Lourdais, O. (2013). Stage dependence of phenotypical and phenological maternal effects: insight into squamate reptile reproductive strategies. *The American naturalist*, 182(2), 223–233. <https://doi.org/10.1086/670809>, 182(2)

Lüdecke, D, Patil, I, Ben-Shachar, MS, Wiernik, BM, Waggoner, P & Makowski, D (2021). see: an R package for visualizing statistical models. *Journal of Open Source Software*, 6(64), 3393. <https://doi.org/10.21105/joss.03393>

Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C., & Diniz, M. S. (2013). Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166(2), 237–243. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2013.06.008>

María, L., Acevedo, R., Soledad, S., Blas, M., & Fuentes-Mascorro, G. (2012). Hemogram and Morphological Characteristics of Blood Cells in the Olive Ridley Turtle (*Lepidochelys olivacea*) of Oaxaca, México. *Revista Científica*, 22(5), 468 - 476.

Martín-del-campo, R., Calderón-campuzano, M. F., Rojas-Ileonart, I., Briseño-dueñas, R., & García-gasca, A. (2021). Congenital malformations in sea turtles: puzzling interplay between genes and environment. *Animals*, 11(2), 444.. <https://doi.org/10.3390/ANI11020444>

Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., & Cortez, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms underlying temperature-dependent sex determination in turtles. *Sexual Development*, 15(1–3), 38–46. <https://doi.org/10.1159/000515296>

Mešťanová, V., & Varga, I. (2016). Morphological view on the evolution of the immunity and lymphoid organs of vertebrates, focused on thymus. *Biologia (Poland)*, 71(10), 1080–1097. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0137>

Muñoz, F. A., Estrada-Parra, S., Romero-Rojas, A., Gonzalez-Ballesteros, E., Work, T. M., Villaseñor-Gaona, H., & Estrada-Garcia, I. (2013). Immunological evaluation of captive green sea turtle (*Chelonia mydas*) with ulcerative dermatitis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(4), 837–844. <https://doi.org/10.1638/2010-0228R4.1>

Muñoz, F. A., Estrada-Parra, S., Romero-Rojas, A., Work, T. M., Gonzalez-Ballesteros, E., & Estrada-Garcia, I. (2009a). Identification of CD3+ T lymphocytes in the green turtle *Chelonia mydas*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 131(3–4), 211–217. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2009.04.015>

Namnum, S. (2002). The Inter-American convention for the Protection and conservation of sea turtles and Its implementation in Mexican law. *Journal of International Wildlife Law and Policy*, 5, 87–103. <https://doi.org/10.1080/13880290209354000>

Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275–301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>.

Núñez, A., Jensen, M. & Abreu-Grobois, A. (2015). Does polyandry really pay off? The effects of multiple mating and number of fathers on morphological traits and survival in clutches of nesting green turtles at Tortuguero. *Peer J*, 3:e880 <https://doi.org/10.7717/peerj.880>.

Owen, J., Punt, J., Stanford, S., & Jones, P. (2007). Inmunidad innata en: *Kuby Inmunología (7ª ed.)*, 146-176. McGraw-Hill INTERAMERICANA EDITORES. ISBN: 978-607-15-1126-3

Perrault, J. R., Miller, D. L., Eads, E., Johnson, C., Merrill, A., Thompson, L. J., & Wyneken, J. (2012). Maternal health status correlates with nest success of leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) from Florida. *PLOS ONE*, 7(2), e31841. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0031841>

Perrault, J. R., & Stacy, N. I. (2018). Note on the unique physiologic state of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) during nesting season as evidenced by a suite of health variables. *Marine Biology*, 165(4), 1–6. <https://doi.org/10.1007/S00227-018-3331-1/FIGURES/1>

Petrosky, K.Y., Knoll, J.S., & Innis, C. (2015). Tissue enzyme activities in kemp's ridley turtles (*Lepidochelys kempii*). *Journal of zoo and wildlife medicine*, 46(3), 637–640. <https://doi.org/10.1638/2015-0014.1>

- Quiñones, J., Quispe, S., Romero, C., & Paredes, E. (2021). Parámetros poblacionales y biológicos de la tortuga verde del Pacífico este *Chelonia mydas agassizii* en Paracas-Pisco, principal zona de reclutamiento en el Pacífico sur este. *Boletín Instituto del Mar del Perú*, 36(1), 106–130. <https://doi.org/10.53554/boletin.v36i1.322>
- Rafferty, A. R., Scheelings, T. F., Foley, L. J., Johnstone, C. P., & Reina, R. D. (2014). Reproductive investment compromises maternal health in three species of freshwater Turtle. *The university of Chicago journal*, 411–419. <https://doi.org/10.1086/675310>
- Ramakrishnan, A., Palanivelrajan, M., Sumathi, D., & Senthilkumar, K. (2020). Biochemical parameter analysis of rescued olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*). *Indian Journal of Animal Research*, 56(1), 24–27. <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-4144>
- Ramiah, S. K., Balakrishnan, K. N., Subramaniam, Y., Iyasere, O. S., & Idrus, Z. (2022). Effects of thermal manipulation on mRNA regulation of response genes regarding improvement of thermotolerance adaptation in chickens during embryogenesis. *Animals*, 12(23), 3354. <https://doi.org/10.3390/ANI12233354>
- Riera-Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2). <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Rios, F. M., & Zimmerman, L. M. (2015). Immunology of reptiles. *eLS*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026260>
- Robledo-Avila, L.A., Phillips-Farfán, B. V., Harfush Meléndez, M., Lopez Toledo, L., Tafolla Venegas, D., Herrera Vargas, Ma. A., Ruíz Cortés, D. V., & Meléndez-Herrera, E. (2022). Short communication: ex-situ conservation in hatcheries is associated with spleen development in *Lepidochelys olivacea* turtle hatchlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 265, 111130. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2021.111130>
- Robledo-Avila, L.A., Phillips-Farfán, B. V., García-Bucio, I.Y., Montes-Sánchez, S., Herrera-Vargas, M.A., Contreras-Garduño, J., Núñez-Anita, R.E., Martínez-Lendeck, N. & Meléndez-Herrera, E. (2023). Incubation in shaded hatcheries biases sex-determination

but preserves *Lepidochelys olivacea* hatchling physiology. *Marine environmental research*, 192, 106244. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106244>

Rousselet, E., Levin, M., Gebhard, E., Higgins, B. M., DeGuise, S., & Godard-Coding, C. A. J. (2013). Evaluation of immune functions in captive immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 156(1–2), 43–53. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2013.09.004>

Säfken, B., Rügamer, D., Kneib, T., & Greven, S. (2021). Conditional model selection in mixed-effects models with caic4. *Journal of Statistical Software*, 99(8), 1–30. <https://doi.org/10.18637/JSS.V099.I08>

Sanchez, E., & Refsnider, J. M. (2017). Immune activity, but not physiological stress, differs between the sexes during the nesting season in painted turtles. *Journal of Herpetology*, 51(4), 449–453. <https://doi.org/10.1670/16-175>

Sarmiento-Ramírez, J. M., Van Der Voort, M., Raaijmakers, J. M., & Diéguez-Uribeondo, J. (2014). Unravelling the microbiome of eggs of the endangered sea turtle *Eretmochelys imbricata* identifies bacteria with activity against the emerging pathogen *Fusarium falciforme*. *PLOS ONE*, 9(4), e95206. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095206>

Sim, E. L., Booth, D. T., & Limpus, C. J. (2015). Incubation temperature, morphology and performance in loggerhead (*Caretta caretta*) turtle hatchlings from Mon Repos, Queensland, Australia. *Biology Open*, 4(6), 685–692. <https://doi.org/10.1242/BIO.20148995>

Smith, G. D., Neuman-Lee, L. A., Webb, A. C., Angilletta, M. J., Dale, -, Denardo, F., & French, S. S. (2017). Metabolic responses to different immune challenges and varying resource availability in the side-blotched lizard (*Uta stansburiana*). *Journal of Comparative Physiology B*, 187, 1173–1182. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1095-4>

Stacy, N. I., Alleman, A. R., & Saylor, K. A. (2011). Diagnostic hematology of reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine* 31(1), 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.006>

Stewart, T. A., Booth, D. T., & Rusli, M. U. (2019). Influence of sand grain size and nest microenvironment on incubation success, hatchling morphology and locomotion

performance of green turtles (*Chelonia mydas*) at the Chagar Hutang Turtle Sanctuary, Redang Island, Malaysia. *Australian Journal of Zoology*, 66(6), 356–368. <https://doi.org/10.1071/ZO19025>

Sykes IV, J. M., & Klaphake, E. (2008). Reptile hematology. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* 11(3),481–500. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.005>

Tedeschi, J. N., Kennington, W. J., Berry, O., Whiting, S., Meekan, M., & Mitchell, N. J. (2015). Increased expression of *Hsp70* and *Hsp90* mRNA as biomarkers of thermal stress in loggerhead turtle embryos (*Caretta Caretta*). *Journal of Thermal Biology*, 47, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.11.006>

Tanabe, LK, Ellis, J, Elsadek, I, Berumen, ML. (2011). Potential feminization of Red Sea turtle hatchlings as indicated by in situ sand temperature profiles. *Conservation Science and Practice*, 2:e266. <https://doi.org/10.1111/csp2.266>

Tedeschi, J. N., Kennington, W. J., Tomkins, J. L., Berry, O., Whitinxg, S., Meekan, M. G., & Mitchell, N. J. (2016). Heritable variation in heat shock gene expression: a potential mechanism for adaptation to thermal stress in embryos of sea turtles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1822). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2015.2320>

Tezak, B., Bentley, B., Arena, M., Mueller, S., Snyder, T., & Sifuentes-Romero, I. (2020). Incubation environment and parental identity affect sea turtle development and hatchling phenotype. *Oecologia*, 192(4), 939–951. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04643-7>

Tizard, I. (2009). Como se activa la inflamación en: *Introducción a la inmunología veterinaria* (8va ed.), 12-26. ELSEVIER. ISBN edición española: 978-84-8086-431-2

Unda-Díaz, N. M., Phillips-Farfán, B. V., Nava, H., Lopez-Toledo, L., Murata, C., Lajud, N., Herrera-Vargas, Ma. A., Arreola Camacho, C. A., Torner, L., Fuentes-Farías, A. L., & Meléndez-Herrera, E. (2022). Negative effects on neurogenesis, ovariogenesis, and fitness in sea turtle hatchlings associated to *ex-situ* incubation management. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10 (850612), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.850612>

Virgin, E. E., Spencer, B. H., Webb, A. C., & Frenc, S. (2022). The immunological and oxidative costs of reproduction and associations between maternal and egg yolk physiology in a reptile. *Ichthyology & Herpetology*, *110*(2), 252–261. <https://doi.org/10.1643/h2021040>

Warner, D. A., Jorgensen, C. F., & Janzen, F. J. (2010). Maternal and abiotic effects on egg mortality and hatchling size of turtles: temporal variation in selection over seven years. *Functional Ecology*, *24*(4), 857–866. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2435.2010.01714.X>

Wickham, H. (2016). *Programming with ggplot2*. 241–253. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_12

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., D', L., McGowan, A., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Lin Pedersen, T., Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, *4*(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/JOSS.01686>

Willmer, P., Stone, G., & Johnston, I. (2005). Environmental physiology of animals. *Environmental physiology of animals* (2a ed., Vol. 5, Número 3, pp. 175–222). Blackwell Publishing Ltd.

Zhang, F. Y., Li, P. P., Gu, H. X., & Ye, M. Bin. (2011). Hematology, morphology, and ultrastructure of blood cells of juvenile olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*). *Chelonian Conservation and Biology*, *10*(2), 250–256. <https://doi.org/10.2744/CCB-0890.1>

Zhang, Q., Chen, B., Yang, P., Zhang, L., Liu, Y., Ullah, S., Wu, L., Waqas, Y., Le, Y., Chen, W., & Chen, Q. (2015). Identification and structural composition of the blood-spleen barrier in chickens. *Veterinary Journal*, *204*(1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.013>

Zhang, Q., Ullah, S., Liu, Y., Yang, P., Chen, B., Waqas, Y., Bao, H., Hu, L., Li, Q., & Chen, Q. (2016). Lymphocyte migration in the micro-channel of splenic sheathed capillaries in chinese soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Micron*, *80*, 66–72. <https://doi.org/10.1016/J.MICRON.2015.09.003>

Zimmerman, L. M. (2018). Reptilia: humoral immunity in reptiles. *Advances in Comparative Immunology*, 751–772. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_20/TABLES/1

Zimmerman, L. M. (2020). The reptilian perspective on vertebrate immunity: 10 years of progress. *Journal of Experimental Biology*, 223(21). <https://doi.org/10.1242/JEB.214171/226152>

Zimmerman, L. M., Paitz, R. T., Vogel, L. A., & Bowden, R. M. (2010). Variation in the seasonal patterns of innate and adaptive immunity in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). *Journal of Experimental Biology*, 213(9), 1477–1483. <https://doi.org/10.1242/JEB.037770>

Zimmerman, L. M., Vogel, L. A., & Bowden, R. M. (2010). Commentary: understanding the vertebrate immune system: Insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(5), 661-671. <https://doi.org/10.1242/jeb.038315>