



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN: RECURSOS BIÓTICOS**

Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales

**Efecto de la reubicación de huevos *ex-situ* sobre
variables morfométricas e inmunológicas en crías
de tortuga marina *Lepidochelys olivacea***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

M. en C. Liliana Areli Robledo Avila



**DIRECTORA DE TESIS: Dra. Esperanza Meléndez Herrera
CO-DIRECTORA DE TESIS: Dra. Alma Lilia Fuentes Farías**

Morelia, Michoacán, mayo 2022

*“No es la **más fuerte** de las especies la que **sobrevive**, tampoco es la más inteligente. Es aquella que se **adapta mejor al cambio.**”*

Charles Darwin



Arribada de *L. olivacea* en el Santuario Playa de la Escobilla, Oax.
22 de noviembre de 2019

A mis amados padres:

Víctor H. Robledo Gutiérrez y Esperanza Avila Vásquez

Por su apoyo, su fe y su amor incondicional depositados en mí y en mi camino a lo largo de mi carrera profesional.

A mis hermanos:

Hugo, Frank y Melisa

Por su amor, sus consejos, sus risas y sus abrazos, siempre me alientan a alcanzar mis metas.

A mis sobrinos:

Romi, David, Vicky, Mati y Mafer

Porque me inspiran a ser mejor persona. Sus sonrisas son mi combustible.

A mis abuelas:

Elvira Franco y María Vásquez

Por su ejemplo de vida, su amor y sus bendiciones, que continúan iluminando mi camino en este mundo terrenal.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada durante mis estudios de posgrado (No. 701881). A la Coordinación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por el financiamiento otorgado a la Dra. Esperanza Meléndez Herrera, del cual fue posible la realización del presente trabajo.

Al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas (PIDCB) y al Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA-UMSNH), por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

Agradezco a mi asesora de tesis la Dra. Esperanza Meléndez Herrera, por darme la oportunidad y la confianza de trabajar en este proyecto que ha sido retador para mi. Así también por su motivación, orientación y lineamientos para llevar a cabo esta tesis.

A mi co-asesora Dra. Alma Lilia Fuentes Farías, por abrirme las puertas del laboratorio de Ecofisiología y brindarme su apoyo y confianza durante mi proceso de formación en el doctorado.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Leonel Lopez Toledo

Dr. Jorge Contreras Garduño

Dr. Joel Edmundo López Meza

Por sus aportaciones en cada evaluación tutorial, las cuales enriquecieron mi proyecto de tesis; agradezco el formar parte de mi preparación doctoral. Así mismo, aprecio su tiempo y dedicación para la revisión de esta tesis.

A los investigadores por su colaboración para el desarrollo de artículos científicos, fruto de este trabajo: Dr. Bryan Phillips Farfán, Dr. David Tafolla Venegas, Dr. Leonel

Lopez Toledo, Dra. Mayra Toledo Cuevas, Dra. Ma. Antonia Herrera Vargas, Dr. Jorge Contreras Garduño y la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita.

Al Centro Mexicano de la Tortuga (CONANP), a la dirección, y a todos los trabajadores del museo, por las facilidades y el apoyo otorgado durante mi estancia de trabajo en campo, realizado en el museo y en el Santuario playa de la Escobilla, Oaxaca.

A la M. en C. Martha Harfush Meléndez, por su amistad, su dedicación y apoyo incondicional hacia mi persona y para la realización del trabajo de campo de este proyecto. Gracias por tu colaboración personal y profesional.

Al M.V.Z. Rafael Villanueva, por su apoyo incondicional y ser mi maestro en el área de la veterinaria durante mi estancia en el museo. Gracias por tu apoyo en campo y por tu maravillosa amistad.

A las biólogas Erika Peralta y Teresa Luna, por el apoyo, la orientación en campo y las facilidades otorgadas durante mi estancia de investigación en el Santuario playa de la Escobilla, Oaxaca.

A todos los integrantes del Centro Ecoturístico de Escobilla, por el apoyo, las facilidades y su confianza otorgada a mi persona y a este proyecto de investigación. Particularmente agradezco a los señores: Pedro, Manuel, Eradio, Sóstenes, y a las señoras: Tere y Flora, por la confianza y ser participes en la logística de campo y traslado de huevos al vivero.

A los jóvenes de la comunidad de Guapinole por el apoyo durante los muestreos.

A la Dra. Valentina Islas Villanueva y la M. en C. Samantha Karam de la Universidad del Mar (UMAR), campus Puerto Ángel. Por su apoyo en campo y asesoramiento durante este proceso. Agradezco las facilidades y el apoyo otorgado durante mi estancia en la UMAR.

A los estudiantes de la UMAR, quienes me apoyaron en campo y por brindarme su compañerismo y su amistad. En particular a la Dra. Elizabeth Labastida y al M. en C. Sergio Gutiérrez.

A la M. en C. Andrea Hernández (UNAM), por su apoyo en la logística de campo, por compartir su conocimiento y brindarme su amistad.

A la Dra. Norma Martínez Lendeck (ENES-UNAM), por su apoyo en los experimentos para la evaluación de estrés oxidante, por compartir su conocimiento y brindarme su amistad.

A mis compañeros y colaboradores, que formaron parte importante de este gran trabajo de investigación, e hicieron agradable mi estancia en el laboratorio de Ecofisiología del INIRENA: Ma. Antonia Herrera; Irma García Bucio, Diana Ruíz Cortés, Citlalli Erandi Jose, Andrea Durán; Yuritzi Avellaneda, Shanen Montes, Morelos Carlos y Edel Pineda.

A mis amigos, mis colegas, por su apoyo personal y profesional. Gracias por tanto cariño, por siempre tener palabras de aliento cuando las necesité. Por caminar a mi lado durante este proceso en mi preparación doctoral.

Abril Serrato, Saúl González, Sebastián Sánchez, Verónica González, Cristina Colín, Lilita Castro, Abraham Villa, Alejandra Mondragón, David Dávila, Mariana Orozco y Berenice Evangelista†.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN GENERAL.....	10
II. ABSTRACT.....	11
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	12
IV. ANTECEDENTES GENERALES.....	15
<i>i. Tortugas marinas y estrategias de conservación</i>	<i>15</i>
<i>ii. Sistema inmunitario de reptiles.....</i>	<i>18</i>
<i>iii. Órganos linfoides.....</i>	<i>20</i>
<i>iv. Respuesta innata.....</i>	<i>20</i>
<i>v. Respuesta adaptativa.....</i>	<i>24</i>
<i>vi. Especie de estudio.....</i>	<i>24</i>
<i>vii. Temperatura de incubación, determinación sexual, estrés térmico y desarrollo embrionario.....</i>	<i>26</i>
V. HIPÓTESIS.....	30
VI. HIPÓTESIS PARTICULARES Y PREDICCIONES.....	31
VII. OBJETIVOS.....	33
i. Objetivo general.....	33
ii. Objetivos particulares.....	33
VIII. CAPÍTULO I. SHORT COMMUNICATION. <i>Ex-situ</i> conservation in hatcheries is associated with spleen development in <i>Lepidochelys</i>	

<i>olivacea</i> turtle hatchlings.....	34
Abstract	
Introduction	
Methods and materials	
Results	
Discussion	
Conclusion	
Funding	
Acknowledgements	
References	
IX. CAPÍTULO II. La reubicación <i>ex-situ</i> sesga la determinación sexual en crías de tortuga marina preservando la función inmunitaria en condiciones basales.....	35
Resumen	
Introducción	
Metodología	
Resultados	
Discusión	
Conclusión	
Literatura citada	
X. DISCUSIÓN GENERAL.....	73
XI. CONCLUSIÓN GENERAL.....	78
XII. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	79

XIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	80
XIV. CAPÍTULO III. Nidos de tortuga marina ¿Por qué controlar su temperatura?	93

I. RESUMEN GENERAL

La reubicación de huevos en nidos *ex-situ* es una de las estrategias más utilizadas para mitigar la pérdida de nidadas de tortugas marinas. Sin embargo, esta estrategia se ha asociado con alteraciones en la ontogénesis del cerebro y las gónadas, así como en el tamaño corporal y el desempeño locomotor en crías a la emergencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la reubicación de huevos en nidos *ex-situ* sobre la respuesta innata y la condición corporal en crías de *Lepidochelys olivacea* a la emergencia del nido. Se evaluó la citoarquitectura de bazo y la cuantificación de leucocitos como indicadores de la configuración inmunitaria. Las variables medidas en plasma sanguíneo como indicadores de la función inmunitaria fueron: 1) actividad de la fosfatasa alcalina; 2) capacidad lítica del sistema del complemento; y 3) capacidad antioxidante-oxidante. Adicionalmente se cuantificó la expresión de las proteínas de choque térmico (HSP) 70 y 90 y del receptor tipo Toll (TLR) 4 en bazo e hígado. Se determinó el tamaño corporal, el sexo de las tortugas y la temperatura de la arena. Se cuantificó el éxito de eclosión y de emergencia de los nidos. Se observó que las temperaturas bajas de la arena en nidos *ex-situ* favorecieron un sesgo hacia los machos. Las crías *ex-situ* presentaron mayor: 1) talla corporal, 2) desarrollo de la citoarquitectura de bazo, 3) proporción de heterófilos; así como una menor proporción de monocitos. Se observó que la reubicación *ex-situ* no alteró la actividad de la fosfatasa alcalina, la capacidad lítica del complemento, ni la expresión de TLR4. Sin embargo, la capacidad antioxidante-oxidante y la expresión de las HSP70 y 90 mostraron una respuesta diferencial. Estos resultados sugieren que la reubicación *ex-situ* está asociada a una mejor configuración inmunitaria y de condición corporal, con un sesgo en la diferenciación sexual, sin alterar su respuesta innata basal. La reubicación *ex-situ* incrementa el éxito de eclosión y de emergencia de las crías de *L. olivacea*, favoreciendo una mayor sobrevivencia.

Palabras clave: reubicación de nidos, eco-inmunología, respuesta innata, configuración inmunitaria, tortugas marinas.

II. ABSTRACT

Sea turtle egg relocation to *ex-situ* hatcheries is an effective strategy to mitigate the loss of clutches. Nevertheless, it alters the ontogenesis of the brain and gonads, as well as body size and locomotor performance at nest emergence. This work evaluated the effect of the egg relocation to *ex-situ* nests on the innate response and body condition of *Lepidochelys olivacea* hatchlings at nest emergence. Splenic cytoarchitecture and leukocyte quantification were used as proxies of the immune configuration. We measured proxies of the immune function in plasma: 1) alkaline phosphatase activity; 2) lytic capacity of complement; and 3) antioxidant-oxidant capacity. Additionally, the expression of heat shock proteins (HSP) 70 and 90 and Toll-like receptor (TLR) 4 in the spleen and liver were quantified. Body size, turtle sex and sand temperature were determined. Hatching success and the emergence success was quantified. Low sand temperatures in *ex-situ* nests favored males. Better immune configuration and body size were associated with *ex-situ* conservation. *Ex-situ* relocation did not alter alkaline phosphatase activity, complement lytic capacity or TLR4 expression. However, the antioxidant-oxidant capacity and expression of HSP70 and 90, showed a differential response. These results suggest that *ex-situ* relocation is associated with a better immune configuration and body condition, with a bias in sexual differentiation, without altering the basal innate immune response. *Ex-situ* relocation increased hatching and emergence success of *L. olivacea*, favoring a higher survival success.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las tortugas marinas, a nivel internacional, son consideradas especies amenazadas (IUCN, 2021). Su vulnerabilidad permanece a lo largo de su ciclo de vida, desde etapas embrionarias hasta etapas juveniles y adultas (Eckert, 2000). Sus principales amenazas son a causa del impacto antropogénico (Mashkour *et al.*, 2020). Para reducir estas amenazas, existen estrategias que promueven la protección de las tortugas a lo largo de su ontogenia. Una de las prácticas más empleadas es la reubicación de huevos a nidos *ex-situ* en viveros una vez que la hembra anidante ovipositó los huevos *in-situ* (Boulon, 2000; Mortimer, 2000). Esta estrategia ha demostrado su eficiencia al incrementar el número de individuos que emergen de los nidos protegidos *ex-situ*. Sin embargo, varios trabajos han sugerido que esta estrategia de conservación altera el desarrollo de las tortugas marinas. De esta manera se ha documentado una disminución en el éxito de la eclosión y la emergencia de las crías, así como una disminución en la talla corporal y en las habilidades motoras (Maulany *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2017; Ware y Fuentes 2018).

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, han evaluado la neurogénesis y la ovariogénesis como indicadores de desarrollo embrionario óptimo en tortugas marinas a la emergencia del nido (machos: Herrera-Vargas *et al.*, 2017 y hembras: Unda-Díaz *et al.*, 2022). Los resultados de estos estudios han demostrado que la incubación *ex-situ* se asocia con alteraciones en el desarrollo de estructuras cerebrales homólogas al hipocampo en mamíferos, así como en los testículos y en los ovarios. Aunque la relevancia funcional de estas alteraciones para la supervivencia de las tortugas aún no ha sido evaluada, estudios previos en

otros vertebrados sugieren que las tortugas tendrán dificultades en su desempeño cognoscitivo, conductual y probablemente en el reproductivo (Lajud y Torner, 2015; Chen y Liu, 2016; Amiel *et al.*, 2017; Monniaux, 2018). Además, los trabajos previos de nuestro grupo han documentado un incremento en el tiempo que las tortugas marinas invierten en re-incorporarse cuando son colocadas sobre su dorso (Unda-Díaz *et al.*, 2022). Este parámetro ha sido utilizado como un indicador de supervivencia en playa, debido a que entre menor tiempo inviertan las crías en alcanzar el mar, mayores serán sus oportunidades de sobrevivir (Stewart *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2020).

Adicionalmente, en un intento por identificar los factores abióticos que podrían alterar el desarrollo de las crías incubadas en nidos *ex-situ*, se ha evaluado el efecto de factores como la temperatura, la humedad y el tamaño de las partículas de arena (Gatto y Reina 2020; Suhaimi *et al.*, 2020; Tezak *et al.*, 2020). Variables como la temperatura, la humedad y el porcentaje de arena gruesa y limo son distintos entre los dos tipos de incubación (*ex-situ* vs *in-situ*). Sin embargo, no ha sido posible identificar la contribución diferencial de cada una de estas variables en los fenotipos observados (Saito *et al.*, 2019; Stewart *et al.*, 2019; Gatto *et al.*, 2021).

La inmunocompetencia puede ser definida como la habilidad que tiene el individuo para diferenciar eficientemente lo propio de lo extraño y desencadenar una respuesta inmunitaria específica para cada patógeno en particular, minimizando el daño tisular y privilegiando la supervivencia del organismo (Pérez *et al.*, 2016). Se ha propuesto que en organismos ectotermos la inmunocompetencia es configurada desde etapas tempranas del desarrollo por factores como: temperatura (Li *et al.*,

2013), humedad (Brown y Shine, 2018) y el efecto materno (ej. tamaño corporal, reserva de nutrientes en huevo, genética) (Booth *et al.*, 2013; Brown y Shine, 2018). Debido a que una de las principales amenazas para la supervivencia de las poblaciones silvestres de tortugas es el incremento de retos infecciosos y no infecciosos (Hoh *et al.*, 2020; Gleason *et al.*, 2020; Mashkour *et al.*, 2020), y aunado a la creciente necesidad de proteger los huevos de tortugas *ex-situ* para garantizar su supervivencia, este trabajo tuvo como objetivo general evaluar el efecto de la estrategia de conservación *ex-situ* sobre el desarrollo del sistema inmunitario y la condición corporal en crías de tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, a la emergencia del nido. Para ello, este trabajo fue dividido en dos capítulos: el primero tuvo como objetivo determinar el efecto de la reubicación de huevos en nidos *ex-situ* sobre la configuración inmunitaria basal (ej. citoarquitectura del bazo y poblaciones leucocitarias) y la talla corporal en crías a la emergencia del nido. El segundo capítulo tuvo como principal interés describir el efecto de la estrategia de conservación sobre algunos de los mecanismos efectores de la respuesta innata (ej. actividad de la fosfatasa alcalina, capacidad lítica del sistema del complemento, actividad oxidante-antioxidante y expresión de proteínas de choque térmico) a la emergencia del nido.

IV. ANTECEDENTES GENERALES

i. Tortugas marinas y estrategias de conservación

En las playas de México anidan seis de las siete especies de tortugas marinas, todas catalogadas como en *peligro de extinción* (P) por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2012. La situación actual de las poblaciones de tortugas marinas es atribuida principalmente a las alteraciones antropogénicas (ej. pesca incidental, contaminación, robo de nidadas y comercio de sus productos; Eckert, 2000), así como a consecuencia del cambio climático (Hawkes *et al.*, 2007), el incremento de la temperatura (Staines *et al.*, 2019), inundaciones, erosión de la playa (Pfaller *et al.*, 2009), y la incidencia de enfermedades emergentes (Mashkour *et al.*, 2020).

En un intento por contrarrestar la potencial extinción de las poblaciones de tortugas marinas, se han implementado estrategias de manejo y conservación que tienen como meta global “*promover su supervivencia a largo plazo, incluyendo la recuperación sostenida de poblaciones diezmadas y la protección de hábitats críticos*” (Eckert, 2000). Una de las estrategias de conservación de nidadas de tortuga principalmente empleadas en todo el mundo por su viabilidad en el manejo y como un potencial programa ecoturístico, es la protección *ex-situ*. Para llevar a cabo esta estrategia, los huevos recién ovipositados *in-situ* por la tortuga anidante son removidos y reubicados en viveros protegidos (Mortimer, 2000). En México esta estrategia de conservación está regulada por la Norma Oficial Mexicana NOM-162-SEMARNAT-2012 (Figura 1). Sin embargo, a pesar de seguir lineamientos internacionales, los nidos *ex-situ* pueden presentar diferencias estructurales, lo cual se ha sugerido podría: 1) incrementar la incidencia de hongos y parásitos (Hoh *et*

al., 2020; Gleason *et al.*, 2020); 2) reducir el éxito de eclosión (Gammon *et al.*, 2020); 3) disminuir el tamaño corporal y la locomoción de las crías (Herrera-Vargas *et al.*, 2017; Bladow y Milton, 2019); 4) sesgar la diferenciación sexual (Jensen *et al.*, 2018); y 5) alterar el desarrollo cerebral y gonadal de las crías a la emergencia (Herrera-Vargas *et al.*, 2017; Unda-Díaz *et al.*, 2022). Sin embargo, debido a las constantes amenazas de depredación humana y animal, así como a factores climáticos, la reubicación de nidos *ex-situ* es la práctica más común y eficiente para favorecer la emergencia de las tortugas marinas. De hecho, es la única opción para poblaciones muy diezmadas como la de la tortuga verde (*Chelonia mydas*), carey (*Eretmochelys imbricata*) y laúd (*Dermochelys coriacea*; IUCN, 2021).

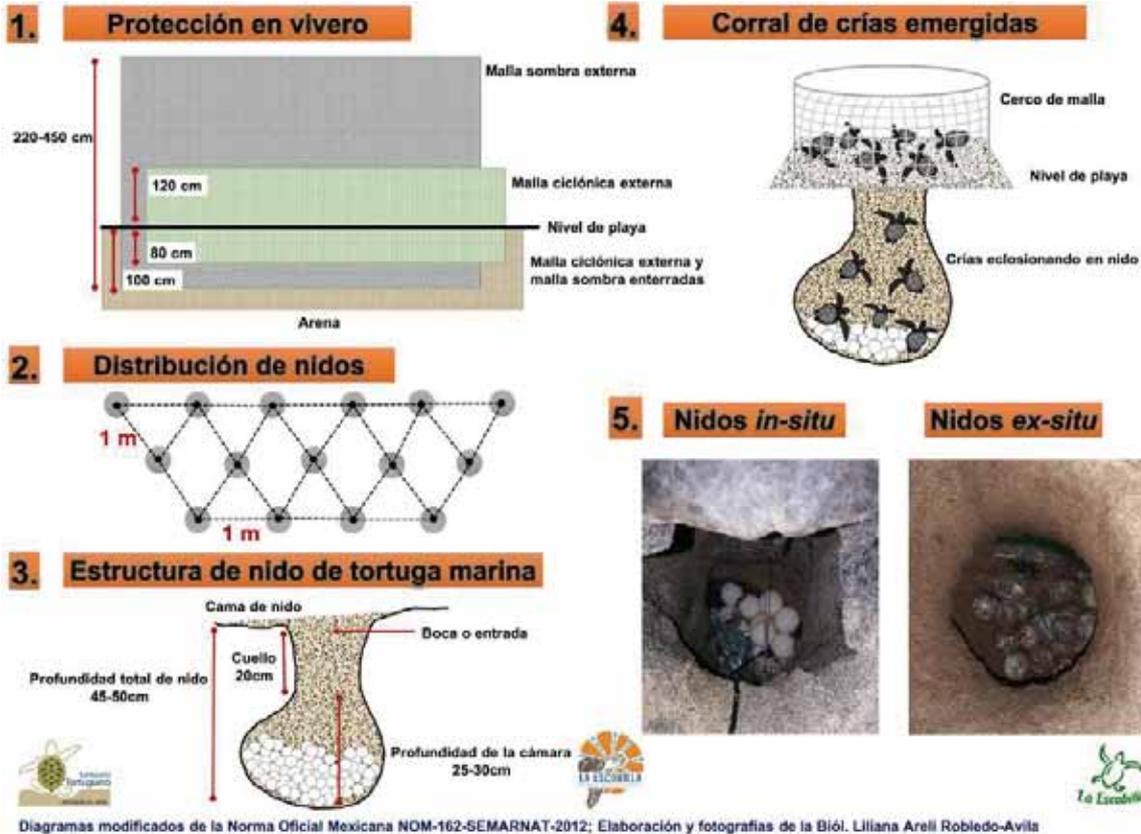


Figura 1. Representación esquemática de las recomendaciones del manejo y distribución de nidos en vivero *ex-situ* para los campamentos en México (NOM-162-SEMARNAT-2012). **1)** Estructura del vivero, se señalan las medidas estándar para la creación y protección de los viveros. **2)** La distancia entre nidos debe tener al menos un metro cuadrado de separación para evitar perturbaciones y se recomienda distribuir los nidos como se observa en la figura. **3)** La estructura y medidas para la construcción de los nidos son específicas de especie. En este caso se presentan las medidas recomendadas para la especie *L. olivacea*. **4)** Confinamiento de crías en cerco previo a la emergencia para llevar a cabo un registro del número que emergen de cada nido para su subsecuente liberación al mar. **5)** Fotografías representativas de la boca y el cuello de los nidos *in-situ* y *ex-situ* evaluados en este trabajo. Dentro de los nidos se observa un sensor, el cual fue colocado para registrar la temperatura durante la incubación.

ii. Sistema inmunitario de reptiles

El sistema inmunitario es el encargado de diferenciar lo propio de lo extraño y asegurar la integridad del individuo a través de funciones como el reconocimiento y la eliminación de células anómalas (ej. potencialmente cancerígenas o dañadas), la reparación tisular (Nicholson, 2016) y la defensa contra patógenos y agentes tóxicos (Zimmerman *et al.*, 2010).

Los reptiles al igual que el resto de los vertebrados presentan una respuesta inmediata o innata y una respuesta tardía o adaptativa. A continuación, se describirán algunos de los principales componentes del sistema inmunitario presentes en reptiles, haciendo énfasis en la respuesta innata (Tabla 1)

Tabla 1. Componentes del sistema inmunitario innato de reptiles y su contraparte en mamíferos*.

Componente	Mamíferos	Reptiles
GENERAL		
<i>Temperatura fisiológica</i>	<i>Endotermos</i>	<i>Ectotermos</i>
BARRERAS FÍSICAS Y QUÍMICAS		
<i>Epitelios</i>	*	*
<i>Enzimas</i>	*	*
<i>Mucílago</i>		*
<i>Sustancias antimicrobianas</i>	*	*
ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS		
<i>Timo</i>	*	*
<i>Médula ósea</i>	*	*
ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS		
<i>Bazo</i>	*	*
<i>Centros germinales/ Agregados de tejido linfoide (PALS y PELS)</i>	<i>Centros germinales</i>	<i>Agregados de tejido linfoide (PALS y PELS)</i>
<i>Placas de Peyer</i>	*	
<i>Tejido linfoide asociado al intestino (GALT)</i>	*	*
<i>Nódulos linfáticos</i>	*	
LEUCOCITOS		
<i>Neutrófilos/Heterófilos</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Heterófilos</i>
<i>Monocitos</i>	*	*
<i>Linfocitos</i>	*	*
<i>Eosinófilos</i>	*	*
<i>Basófilos</i>	*	*
<i>Azurófilos</i>		*
CITOCINAS		
ENZIMAS		
<i>Fosfatasas</i>	*	*
<i>Lisozimas</i>	*	*
SISTEMA DE COMPLEMENTO		
<i>Vía Alternativa</i>	*	*
<i>Vía Clásica</i>	*	*
<i>Vía de las Lectinas</i>	*	*

Modificado de Biller-Takahashi y Urbinati, 2014; Zimmerman, 2020. Se destacan en rojo los componentes que fueron evaluados en el presente trabajo.

iii. Órganos linfoides

Los órganos linfoides primarios de los reptiles son la médula ósea y el timo. En estos sitios se originan, desarrollan y maduran las células del sistema inmunitario. La médula ósea es el sitio de hematopoyesis, y el timo es el lugar donde los linfocitos T alcanzan la madurez y su estadio de competencia funcional (Pérez-Torres, 2016). Los órganos linfoides secundarios de los reptiles están integrados por el bazo y el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés). El bazo es el órgano más importante para el desarrollo de la respuesta humoral en reptiles y funge como un filtro de eritrocitos senescentes y/o dañados (Kassab *et al.*, 2009; Stacy *et al.*, 2021). Este órgano está involucrado en el reciclaje y almacén de hierro, y permite la presentación antigénica (Neely y Flajnik, 2016). Sin embargo, no presenta nódulos linfoides y no forma centros germinales, como en el caso de los mamíferos (Neely y Flajnik, 2016; Zimmerman *et al.*, 2010). La organización celular del bazo en reptiles se caracteriza principalmente por dos regiones: la pulpa roja, formada por eritrocitos y melanomacrófagos; y la pulpa blanca, formada por linfocitos T y B agregados en el tejido linfoide asociado a las vainas periarteriolas (PALS) y perielipsoidales (PELS) (Zhang *et al.*, 2019a). Por su parte, la mucosa del GALT posee los componentes necesarios para dar inicio a una respuesta inmunitaria (ej. linfocitos B, T y células dendríticas), atrapando y procesando antígenos en las paredes intestinales (Tizard, 2009).

iv. Respuesta innata

La respuesta innata es la primera línea de defensa frente a los microorganismos, es de acción rápida (ej. horas a días), inespecífica (ej. distinción entre diversos tipos

de patógenos) y no genera memoria inmunitaria. En reptiles la respuesta innata es robusta, e incluye un grupo diverso de moléculas y células homólogas a las de mamíferos (Zimmerman *et al.*, 2010). Sus principales componentes son: a) barreras físicas, químicas y microbiológicas (ej. epitelios, enzimas, mucílago y sustancias antimicrobianas); b) células fagocíticas, inflamatorias y citolíticas como heterófilos (homólogos de neutrófilos), macrófagos eosinófilos, basófilos y células asesinas naturales; c) proteínas sanguíneas como los factores del sistema del complemento, enzimas (ej. fosfatasas y lisozimas) y otros mediadores de la inflamación (ej. especies reactivas de oxígeno o ROS por sus siglas en inglés) (Biller-Takahashi y Urbinati, 2014; Ferat, 2016; Bojalil-Parra *et al.*, 2016; Rader, 2017).

Las fosfatasas alcalinas son isoenzimas localizadas en la membrana celular capaces de catalizar por hidrólisis a fosfatos orgánicos presentes en el espacio extracelular (Sharma *et al.*, 2014). Para llevar a cabo dicha hidrólisis requieren de cofactores como el zinc (Zn⁺) y el magnesio (Mg⁺). Estas isoenzimas se encuentran de manera general en diferentes tejidos (ej. hígado, riñón, intestino, tejido óseo), y son liberadas al torrente sanguíneo a través del hígado y el tejido óseo, principalmente. El suero concentra poco más del 80% de las fosfatasas inespecíficas (Rader, 2017). Estos niveles son dependientes del desarrollo del individuo, de manera que se presentan en mayores concentraciones en etapas de crecimiento y desarrollo óseo (Moss, 1987). En reptiles se ha descrito que la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina se incrementa durante la inflamación y en presencia de un estrés oxidante (Dang *et al.*, 2015).

En reptiles se ha descrito que el sistema del complemento actúa a través de tres vías: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas (Zimmerman, 2020). La

vía alternativa es uno de los mecanismos más estudiados en reptiles. Esta vía se activa cuando las proteínas reconocen de manera directa patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) o por contacto con las membranas celulares. La cascada inicia con la hidrólisis de la proteína C3, lo que da lugar a la amplificación del factor C3bBb3b, un complejo de proteínas que a su vez permite la activación de la convertasa de C5 iniciando así la fase lítica (Ferat *et al.*, 2016; Riera-Romo *et al.*, 2016). La vía alternativa del complemento desempeña un papel importante en la fase temprana de las infecciones y en la respuesta inmunitaria de los neonatos (Ferat *et al.*, 2016). Se ha descrito que en los reptiles esta vía tiene la mayor capacidad lítica, superior a la de las aves y mamíferos (Merchant *et al.*, 2005).

Las ROS son moléculas intermediarias de corta duración producto de varias reacciones enzimáticas como la fosforilación oxidativa, el metabolismo de los lípidos en los peroxisomas, la actividad de las ciclooxigenasas y otras actividades celulares (Costantini y Møller, 2009; Sies *et al.*, 2017). Las ROS participan en varios procesos fisiológicos como la señalización y la proliferación celular, la inflamación, la fagocitosis y la generación de agentes antimicrobianos (Sies *et al.*, 2017). Sus funciones son reguladas por moléculas antioxidantes, ya que el desbalance en su favor puede conducir a la alteración de las reacciones de oxidación-reducción y al daño molecular. Este estado de desbalance se conoce como estrés oxidante. Existen varias especies reactivas de oxígeno, siendo las más comunes el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A su vez, existen antioxidantes no enzimáticos que se agrupan en pequeñas moléculas y proteínas (Lesser, 2006), y antioxidantes enzimáticos como la Superóxido Dismutasa (SOD), la catalasa y la

glutación peroxidasa (Rahal *et al.*, 2014). La expresión de estas enzimas es dependiente del nivel de las ROS (Regoli y Giuliani, 2014). En lagartijas se ha demostrado que los machos presentan un estallido oxidante (asociado a la fagocitosis) de mayor intensidad que las hembras ante un reto con el lipopolisacárido de *Escherichia coli* (Tobler *et al.*, 2015). Por su parte, las hembras presentan una mayor respuesta antioxidante ante el mismo reto, lo que sugiere que existe una respuesta diferencial entre sexos en la respuesta inmunitaria (Tobler *et al.*, 2015). Así mismo, en tortugas se ha demostrado una respuesta antioxidante diferencial de los órganos (ej. cerebro, riñón, hígado, bazo) ante un estresor oxidante exógeno, siendo el bazo el órgano más sensible al daño oxidante (Zhang *et al.*, 2019b).

Los reptiles poseen un gran número de receptores que reconocen PAMPs y patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMPs). Estos receptores se localizan en las células de la respuesta inmunitaria y desencadenan los principales mecanismos efectores de la inmunidad innata: fagocitosis, lisis, inflamación y respuesta antiviral. Los receptores tipo Toll (TLR) reconocen PAMPs y DAMPs y se expresan en macrófagos, neutrófilos/heterófilos y otras células inmunitarias. Estos receptores se localizan en la membrana celular y en endosomas con el objetivo de reconocer invasores extracelulares e intracelulares. Los TLR que se expresan en la superficie celular son los TLR2, 4 y 5, los cuales reconocen proteínas, lipoproteínas y lipopolisacáridos microbianos. En particular, los TLR4 unen al lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas. La interacción de los TLR con los PAMPs incrementa la fagocitosis (Tizard, 2009; Nicholson, 2016). Otros receptores como el TLR7 y 9 se

encuentran en endosomas y reconocen patógenos intracelulares o fagocitados (Zhang *et al.*, 2017).

v. *Respuesta adaptativa*

La respuesta adaptativa se activa días después de iniciado el reto inmunitario y se presenta de manera tardía (ej. días o semanas), siendo más específica y generando memoria para hacer frente a los microorganismos en una segunda interacción de manera más eficiente (Yatim y Lakkis, 2015). Esta respuesta involucra la activación de linfocitos T y B, así como la producción de anticuerpos. En reptiles al momento se han descrito cuatro isotipos de anticuerpos homólogos a aquéllos presentes en mamíferos (ej. IgA, IgD, IgM e IgY) (Zimmerman, 2020). Sin embargo, su función no está completamente dilucidada y parecen activarse con retraso con respecto a los tiempos de respuesta descritos en mamíferos (Work, 2000).

vi. *Especie de estudio*

La tortuga *Lepidochelys olivacea* es una de las especies con menor tamaño corporal. El adulto promedio llega a medir de 60 a 73 cm de largo curvo de caparazón, y de 63 a 78 cm de ancho curvo del caparazón. Estas tortugas presentan una alimentación omnívora, con mayor tendencia a carnívora. No se tiene clara la edad de su maduración sexual; sin embargo, se calcula que ésta puede ocurrir entre los 10 y los 18 años (Peralta y Luna, 2016). Como en el resto de las tortugas marinas, el dimorfismo sexual sólo se aprecia en individuos adultos, siendo los machos quienes poseen una cola más larga que las hembras, así como uñas más largas y curvadas de las aletas anteriores. Se sabe que estos reptiles marinos son

polígamos y presentan un ciclo reproductivo anual, con uno a tres desoves por temporada (Peralta y Luna, 2016).

Las hembras de esta especie pueden presentar anidación en solitario o en arribada (Valverde *et al.*, 2012). Durante la anidación en arribada cientos y miles de tortugas se sincronizan para reproducirse cerca de la playa, salir y anidar en la misma playa (Valverde *et al.*, 2012). En México, este patrón de anidación solo se presenta en tres playas: Morro Ayuta y el Santuario de playa La Escobilla en Oaxaca, así como en la playa de Colola en Michoacán. En los meses de mayor actividad, la anidación en arribada dura cinco días en promedio, con un tiempo aproximado de 45 minutos por evento, desde que la hembra sale del mar, identifica el sitio, elabora el nido, desova, tapa el nido y regresa al mar (Peralta y Luna, 2016). En el Pacífico Mexicano este comportamiento de anidación en arribadas ocurre durante el periodo de julio a enero, señalando a septiembre y octubre como los meses donde la anidación alcanza su punto máximo. En promedio una hembra de *L. olivacea* oviposita hasta 100 huevos por nidada, con 45 días de incubación promedio *in-situ*. En el caso particular del Santuario de playa La Escobilla, el promedio de huevos por nido es de 94 (Peralta y Luna, 2016). La temperatura óptima de incubación de los nidos se encuentra entre 30 - 32 °C, y la mortalidad de los huevos/crías aumenta por encima de los 34 °C y por debajo de los 27 °C (temperaturas letales) (Valverde *et al.*, 2010).



Figura 2. Hembra de *Lepidochelys olivacea* anidando *in-situ* en El Santuario de la Escobilla, Oax. Fotografía: Edgar Noriega-Díaz, Asesor técnico de la Sociedad Cooperativa “El Santuario de las Tortugas La Escobilla”, Sc de RLde CV.

vii. *Temperatura de incubación, determinación sexual, estrés térmico y desarrollo embrionario*

El segundo tercio de incubación es determinante para el desarrollo óptimo de las crías. Factores bióticos (ej. efecto paterno y materno, contenido de materia orgánica y microbiota del nido) (Booth *et al.*, 2013; Bézy *et al.*, 2015; Tezak *et al.*, 2020; Hoh *et al.*, 2020) y abióticos (ej. temperatura, humedad, tamaño de grano de arena, intercambio gaseoso) (Wallace *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2014; Stubbs y Mitchell, 2018; Suhaimi *et al.*, 2020) contribuyen para definir el desarrollo de las crías. Entre los factores más estudiados se encuentra la temperatura, la cual determina el sexo de las crías entre los días 17 y 23 del segundo tercio de incubación (Merchant-Larios *et al.*, 2010). Temperaturas de incubación alrededor de los 28 °C favorecen la determinación sexual de machos, mientras que temperaturas alrededor de los 32 °C promueven la diferenciación de hembras (Merchant-Larios y Díaz-Hernández,

2012). Las temperaturas óptimas para favorecer proporciones sexuales 1:1 se encuentran entre los 30 y 31 °C (McCoy *et al.*, 1983; Wibbels, 1998).

Además de la determinación sexual, la temperatura de incubación tiene efectos importantes sobre el desarrollo de los órganos linfoides y la respuesta inmunitaria en reptiles. En lagartijas se ha descrito que el desarrollo de los órganos linfoides (ej. timo y bazo), así como del hígado comienzan a partir del segundo tercio de incubación (El Deeb y Saad, 1990). En tortugas de agua dulce (*Mauremys mutica*) se ha evidenciado que la temperatura puede alterar el tamaño y la citoarquitectura del hígado y bazo, así como la expresión de ROS y de proteínas de choque térmico (HSP) (Li *et al.*, 2021). Las HSP constituyen una familia de proteínas involucradas en el transporte, plegamiento, ensamblaje y degradación de otras proteínas durante situaciones de estrés térmico, hipoxia, toxicidad o enfermedades (Iwama *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2018). En ectotermos la regulación de las HSP ha sido relacionada con su capacidad para tolerar temperaturas extremas (Gao *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2021). Debido a que durante la incubación los embriones son particularmente sensibles a los cambios extremos de temperatura, la regulación de las HSP podría contribuir a mantener los procesos fisiológicos dentro de rangos aceptables. Esta hipótesis ha sido evaluada recientemente en embriones de tortugas, en los cuales la expresión de la HSP70 y 90 incrementa la tolerancia a temperaturas altas y por lo tanto el éxito de eclosión (Gao *et al.*, 2014; Tedeschi *et al.*, 2015).

En lagartijas, se ha evidenciado que el crecimiento, la morfología, el desempeño locomotor y la respuesta inmunitaria de las crías al nacimiento, depende fuertemente de factores dependientes de la temperatura, ligados al sexo y la

concentración de hormonas sexuales (Sacchi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019b; Leivesley & Rollinson, 2021). En crías de tortuga de agua dulce se ha reportado que las temperaturas extremas (fuera de su rango óptimo específico de especie), así como temperaturas altas y constantes, disminuyen el tamaño corporal, el desempeño locomotor (Li *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2018) y la eficiencia en la respuesta del sistema inmunitario (Dang *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2021). En crías de tortugas marinas, se ha reportado que las temperaturas constantes mayores a 33 °C sesgan la determinación sexual hacia hembras (Wood *et al.*, 2014), y en conjunto con el tamaño de grano de arena y la presión parcial del oxígeno en la cámara de nido, pueden propiciar a una disminución en el éxito de eclosión de las crías, con incidencia de altas temperaturas durante la incubación (Hart *et al.*, 2016; Stewart *et al.*, 2019; Saito *et al.*, 2019). Además, estas temperaturas tienen efectos negativos sobre el crecimiento de los individuos (Stubbs y Mitchell, 2018), su desplazamiento y el nado posterior a la emergencia (Kobayashi *et al.*, 2017; Stewart *et al.*, 2019; Mueller *et al.*, 2019). Adicionalmente, temperaturas altas promueven un incremento en las poblaciones de heterófilos, basófilos y alteraciones en otros parámetros de la inflamación (Fleming *et al.*, 2020).

Se ha descrito que la reubicación de nidos tiene efectos negativos para la supervivencia de las crías de tortuga marina (Herrera-Vargas *et al.*, 2017; Unda-Díaz *et al.*, 2022), probablemente asociados a temperaturas de incubación que difieren de las prevalecientes en condiciones *in-situ* (Maulany *et al.*, 2012a; Kobayashi *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no se ha descrito el efecto de la reubicación de nidos a viveros sobre la respuesta inmunitaria en crías a la emergencia del nido.

Debido al incremento en la temperatura ambiental, al concomitante incremento en las enfermedades emergentes y re-emergentes que amenazan a las poblaciones silvestres de reptiles y a la creciente necesidad de protección de los huevos de tortuga marina en viveros, se vuelve necesario entender cómo la reubicación de nidos puede alterar la respuesta innata en crías de tortuga a la emergencia del nido.

V. HIPÓTESIS

i. Hipótesis general

La incubación de huevos en nidos reubicados *ex-situ* deprime la respuesta innata y decrementa la condición corporal de las crías de tortuga *Lepidochelys olivacea* a la emergencia del nido.

VI. HIPÓTESIS PARTICULARES Y PREDICCIONES

Hipótesis capítulo I.

- 1) La reubicación de huevos en nidos *ex-situ* retrasa el desarrollo y la citoarquitectura de órganos linfoides en crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido.

Predicción: Un retraso en el desarrollo y la citoarquitectura de bazo en las crías recién emergidas de nidos *ex-situ*.

- 2) La reubicación de huevos en nidos *ex-situ* altera los porcentajes de poblaciones leucocitarias en sangre periférica de crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido.

Predicción: Una mayor proporción de heterófilos y monocitos en plasma sanguíneo de las crías de nidos *ex-situ*.

- 3) La reubicación de huevos en nidos *ex-situ* disminuye la masa y el tamaño corporal en crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido.

Predicción: Crías de nidos *ex-situ* de tamaño pequeño y de baja masa corporal.

- 4) La reubicación de huevos *ex-situ* disminuye el éxito de eclosión y el éxito de emergencia en nidos de *L. olivacea*.

Predicción: Porcentajes de éxito de la eclosión y de la emergencia igual o menores al 50% en nidos *ex-situ*.

Hipótesis capítulo II.

- 1) La reubicación de huevos en nidos *ex-situ* disminuye la actividad de la fosfatasa alcalina y la capacidad lítica del sistema del complemento, evaluado en plasma sanguíneo de crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido.

Predicción: Una disminución en la actividad de la fosfatasa alcalina y en la capacidad lítica del sistema del complemento en las crías de nidos *ex-situ*.

- 2) La reubicación de huevos en nidos *ex-situ* incrementa la actividad de agentes oxidantes y disminuye la actividad de los antioxidantes, evaluados en plasma sanguíneo de crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido.

Predicción: Un desequilibrio a favor de agentes oxidantes sobre la actividad de los antioxidantes en plasma sanguíneo en las crías de nidos *ex-situ*.

- 3) La reubicación de huevos en nidos *ex-situ* incrementa la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) 70 y 90 y disminuye la expresión del receptor tipo Toll (TLR) 4, en bazo e hígado de crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido.

Predicción: Un incremento en la expresión de HSP70 y HSP90 y una menor expresión del receptor TLR-4, en bazo e hígado de las crías de nidos *ex-situ*.

VII. OBJETIVOS

i. Objetivo general

Evaluar el efecto de la reubicación de huevos en nidos *ex-situ* sobre la respuesta innata y la condición corporal en crías de *Lepidochelys olivacea* a la emergencia del nido.

ii. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la reubicación de huevos en nidos *ex-situ* sobre la citoarquitectura de órganos linfoides y poblaciones leucocitarias en crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido.
2. Evaluar el efecto de la reubicación de huevos en nidos *ex-situ* sobre la actividad de la fosfatasa alcalina, la capacidad lítica del sistema del complemento y el estrés oxidante en el plasma sanguíneo, así como la expresión de proteínas de choque térmico y del receptor tipo toll 4, en hígado y bazo de crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido.

Cada uno de los objetivos particulares será abordado en un capítulo independiente a continuación.

VIII. CAPÍTULO I.

SHORT COMMUNICATION. *Ex-situ* conservation in hatcheries is associated with spleen development in *Lepidochelys olivacea* turtle hatchlings

Publicado en: Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 265 (2022) 111130
doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111130



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpa

Short communication

Short communication: *Ex-situ* conservation in hatcheries is associated with spleen development in *Lepidochelys olivacea* turtle hatchlingsLiliana Areli Robledo-Avila^a, Bryan Víctor Phillips-Farfán^b, Martha Harfush Meléndez^c, Leonel Lopez Toledo^a, David Tafolla Venegas^d, Ma. Antonia Herrera Vargas^a, Diana Vanessa Ruíz Cortés^a, Esperanza Meléndez-Herrera^{a,*}^a Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. San Juanito Itzácuaro s/n, Colonia Nueva Esperanza, C. P. 58337 Morelia, Michoacán, México^b Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700, Letra C, Alcaldía Coyoacán C.P. 04530, Cd. de México, México^c Centro Mexicano de la Tortuga CONANP-SEMARNAT, Oaxaca, México^d Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida Francisco J. Múgica s/n, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Eco-immunology
Leukocytes
Innate immune system
Temperature-sex determination
Immune configuration
Hatching success
Emergence success

ABSTRACT

Ex-situ conservation in hatcheries is a successful strategy for the recovery of sea turtle populations. However, it alters the ontogenesis of the brain and gonads, as well as body size and locomotor performance at nest emergence. Relocation to hatcheries may alter immune system development, since this depends highly on the nest environment. We hypothesized that *ex-situ* brooding would negatively associate with immune traits of *Lepidochelys olivacea*. Splenic cytoarchitecture and leukocyte quantification were used as proxies for the immune configuration. Body size, gonadal sex and sand temperature during incubation were determined. Additionally, the success of nest hatching and emergence was quantified. Linear mixed models of splenic cytoarchitecture, leukocyte proportions and body size, using sex and nest type as explanatory variables, evaluated the effects of *ex-situ* brooding. Generalized linear mixed models using quasibinomial distributions (log link) analyzed effects on hatching and emergence success. Hatchlings from *ex-situ* nests were heavier, larger and showed a greater spleen-somatic index. They showed more and better defined splenic periarteriolar lymphoid sheaths, as well as a higher proportion of heterophils but less monocytes. Moreover, *ex-situ* brooding increased hatching and emergence success. Sand temperatures in hatcheries favored male sex determination, while the opposite occurred for *in-situ* incubation. Interestingly, the immune configuration and body size were independent of sex but associated with *ex-situ* conservation. Greater body size promotes early hatchling survival, while better spleen development is related to a greater antibody production and a better immune response to pathogens. Altogether, the results suggest that *ex-situ* incubation is associated with a better immune configuration and higher survival success.

1. Introduction

Conservation of endangered sea turtle species (IUCN, 2021) often uses *ex-situ* hatchery brooding. This is the best strategy when threats to *in-situ* incubation exist, such as flooding, overheating, animal predation and poaching. However, *ex-situ* relocation decreases brain and gonadal development, as well as diminishing body size and locomotor performance in newly born turtles (Herrera-Vargas et al., 2017; Tanabe et al., 2021).

Sea turtles also face infectious and non-infectious diseases which have increased globally, likely associated with climatic change,

overcrowding in captivity and pollution (Mainwaring et al., 2016; Mashkour et al., 2020). Endangered populations face immunological challenges, such as spirorchidiasis, fibropapillomatosis and dermatitis (Muñoz et al., 2013; Keller et al., 2014; Pace et al., 2019). Although the etiology of these diseases is debated, they are mostly caused by infectious pathogens (Sarmiento-Ramírez et al., 2014; Cable et al., 2017). Nevertheless, the sole presence of pathogens does not cause disease. For example, the presumptive causes of fibropapillomatosis (papillomavirus CmPV-1) and fusariosis (*Fusarium solani*) are registered in healthy turtles and eggs (Hoh et al., 2020; Mashkour et al., 2020). The immune status of green turtles has been linked with the prevalence of fibropapillomatosis

* Corresponding author.

E-mail address: emelendez@umich.mx (E. Meléndez-Herrera).<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111130>

Received 24 August 2021; Received in revised form 20 December 2021; Accepted 20 December 2021

Available online 23 December 2021

1095-6433/© 2021 Published by Elsevier Inc.

(Perrault et al., 2021; Sposato et al., 2021). This highlights the relevance of immune competence for sea turtles. However, the ontogeny of their immune competence is still relatively unknown (Rousselet et al., 2013; Fleming et al., 2020).

Genetic, environmental and maternal-health factors shape the configuration and function of the immune system in hatchlings of soft-shelled turtles and snakes (Freedberg et al., 2008; Brown and Shine, 2016; Lu et al., 2021; Palacios et al., 2020). Indeed, the configuration of the immune phenotype during embryonic and early postnatal development is essential to face future immune challenges (Palacios et al., 2020; Lu et al., 2021). Temperature is an important environmental variable determining the immune phenotype (Dang et al., 2015a, 2015b). For example, hotter temperatures during incubation decrease several immune parameters, such as serum alkaline phosphatase and hemolytic complement activity, as well as the expression of genes related to immune function (i.e., IgD, IgM and CD3 γ) in the liver of soft-shelled turtles. Consequently, higher temperatures increase cumulative mortality in neonates and adults (Freedberg et al., 2008; Dang et al., 2015a). Moreover, higher *in-situ* incubation temperatures increase the absolute number of heterophils, basophils and other inflammation parameters in *Caretta caretta* hatchlings (Fleming et al., 2020).

Incubation temperature determines sex in several reptiles; making it complicated to separate their effects on immune function (Freedberg et al., 2008). Interestingly, studies in reptiles with genetic sex determination have shown an independent effect of temperature on the immune response (Dang et al., 2015b). Sand temperature can vary in the same nesting beach according to factors like season, distance from vegetation and shoreline, as well as shading (Fleming et al., 2020; Reboul et al., 2021). Thus, the *ex-situ* environment could alter immune system development. However, the effect of *ex-situ* conservation on the immune response of marine turtles is unknown. This is relevant due to the increasing threat of infections on free-living populations and the need to protect complete egg clutches in hatcheries.

To understand if nest type is associated with immune traits and body condition, we compared spleen development, leucocyte count and body size in hatchlings from *in-situ* and *ex-situ* nests. Additionally, we evaluated hatching and emergence success between conditions. The spleen participates in the humoral response of reptiles (Hussein et al., 1979; Kassab et al., 2009), as well as filtration and removal of senescent erythrocytes (Stacy et al., 2021). In mammals and birds, embryonic spleen histology is associated with maturation of the immune response (Corbin et al., 2008; Zhang et al., 2019). Lymphocytes are the most common circulating leukocytes in juvenile and adult sea turtles, followed by heterophils, monocytes and a lesser proportion of basophils and azurophils (Rousselet et al., 2013). Lymphocytes are associated predominantly with the adaptive immune response, while other leukocytes are related to the innate response (Rousselet et al., 2013). Heterophilia in reptiles is related to infections, tissue injury, necrosis and increased glucocorticoid levels (Stacy et al., 2011), whereas lymphopenia is associated with chronic inflammation, immunosuppression and systemic bacterial infections (Work et al., 2003).

2. Methods and materials

This study was conducted during November 2018–2019; at Playa La Escobilla in Oaxaca, Mexico (15° 47.1' N, 96° 44.3' W). Egg manipulation was kept to a minimum by hatchery staff following protocols stated in Mexican law (NOM-162-SEMARNAT-2012) and a prior report (Herrera-Vargas et al., 2017). Briefly, three days after massive turtle arrival started, nesting females were identified for three consecutive nights of beach patrolling. Thirty-eight random nests were chosen and sheltered, immediately after the female covered the eggs and left (18 in 2018, 20 in 2019). Of these, 19 arbitrary nests remained undisturbed *in-situ* (9 in 2018, 10 in 2019). The complete clutch of the other 19 nests (9 in 2018, 10 in 2019) was carefully collected, placed in individual mesh-cotton bags and transported to the hatchery. There, they were immediately

buried in previously built nests and remained undisturbed until emergence. The time between laying and re-burial lasted less than two hours. Efforts were made to avoid egg rotation and excessive handling, as well as to emulate natural nest architecture in hatcheries. Sand temperature was registered by data loggers (Onset HOBO® Bluetooth Pendant MX2200 and UA-002-64; accuracy \pm 0.2 °C) placed inside the nests (23 *in-situ*, 14 *ex-situ*; approximately 35 cm deep; Van De Merwe et al., 2005). Temperature was recorded every hour during incubation.

In-situ nests were observed daily, from incubation day 44, to identify signs of turtle emergence. No hatchlings emerged from labeled clutches; thus, at incubation day 49 (i.e., five days after the emergence date predicted by sand temperatures), a beach area of approximately 300 m² (including the 23 data loggers) was patrolled to identify nests with emerging turtles. Nineteen nests were selected (9 in 2018, 10 in 2019). Hatchlings from *ex-situ* nests emerged on incubation day 53 (2018) and 50 (2019). Data-loggers were recovered at incubation day 50 from *in-situ* nests and the day of emergence from *ex-situ* nests.

Animal handling, euthanasia and sampling protocols were approved by an Animal Rights Committee, under License Number SEMARNAT: SGPA/DGVS/007122/18 and SGPA/DGVS/9040/19; according to Mexican regulation (NOM-033-SAG/ZOO-2014). Hatchlings (134) were collected from *in-situ* and *ex-situ* clutches (3 hatchlings/nest during 2018 and 4 hatchlings/nest during 2019).

Hatchling collection consisted of randomly capturing turtles at 5-min intervals, as soon as they surfaced from the nest (Herrera-Vargas et al., 2017). They were weighted with a digital precision balance (OHAUS™ Scout Pro Sp 602, Max 600 g, d = 0.01 g) and their straight carapace length was measured using a digital Vernier (Mitutoyo™, Max 200 mm, d = 0.03 mm). Hatchlings were quickly euthanized with a single cut between the skull and first cervical vertebra using a razor. A blood sample was stained with Wright's hematoxylin to quantify leukocyte populations (i.e., lymphocytes, heterophiles, monocytes, eosinophils, basophils and azurophils) from 100 cells at 1000 x magnification (Stacy and Boylan, 2014). Since few basophils, eosinophils and azurophils were quantified, they were not included in subsequent analyses.

The spleen was obtained, weighed using an analytical balance (Mettler Toledo, MX, Max 5.1 g, d = 1 μ g), dehydrated using increasing ethanol concentrations, embedded in paraffin and longitudinally sliced (5 μ m) with a microtome (Leica). Spleen sections were deparaffinized and stained with hematoxylin-eosin (Merck). Microphotographs were captured with a Leica DM3000 microscope using the Leica Application Suite. The number and length of peri-arteriolar lymphoid aggregates (PALS; Bao et al., 2009; Mustafa and El-Desoky, 2020) per mm² was quantified in 10 equivalent non-consecutive slices per hatchling (one every 40 μ m from the most central regions) using NIH ImageJ. The spleen-somatic index [spleen mass (mg)/body mass (g) x 100%; Xu et al., 2020] was calculated. Sex was identified using transversal sections of the gonad-mesonephros complex (5 μ m, Herrera-Vargas et al., 2017). Body size and leukocyte quantification data included all hatchlings. Some gonads (5 unsexed turtles) and spleens (from 3 nests) were lost during tissue processing. Splenic analysis was performed in 1–3 hatchlings/nest, since one spleen/nest was frozen for later analysis.

Nests (33/38) were inventoried 72 h after sampling (except five, which were not recovered) to determine hatching and emergence success (Read et al., 2012; Kobayashi et al., 2017). Briefly, the number of eggs/nest was quantified (from fragments representing >50% of the egg and unhatched eggs). Hatching success (%) was calculated: 100 x (eggs - unhatched eggs) / eggs. Emergence success (%) was also calculated: 100 x [eggs - (unhatched eggs + dead hatchlings + live hatchlings)] / eggs.

Linear mixed models were performed for the response variables: body mass and length, spleen-somatic index, PALS density and length, as well as the number of representative leukocytes. The models included the following fixed effects: *in-situ* vs. *ex-situ* (main), sex and its interaction with the main effect. Turtles within clutches was the random effect (given their non-independence). A notable sex bias was found (see below); but linear mixed models for 2018 showed that this bias had no

significant effects on the response variables between *in-situ* vs. *ex-situ* nests. Thus, the combined effect of *in-situ* vs. *ex-situ* nests and sex on the variables of interest for both years was evaluated. Stepwise backward elimination followed by conditional Akaike Information Criterion (cAIC) determination were performed to select the best model. Residuals for each model were plotted to assess the distribution of the model fits (Supplementary Data). The marginal R^2 was determined as a measure of the proportion of variance explained by the model. The predictions of the final models were graphed with GraphPad Prism Version 84.0. The effects of *ex-situ* brooding on hatching and emergence success were evaluated by random-intercept generalized linear mixed models with binomial distributions (log link) using condition (*in-situ* vs. *ex-situ*) as a fixed factor and clutch as a random factor. The fixed factor effect was estimated using Type II Wald Chi-square tests.

All data analyses were performed using R R Core Team, 2020 and RStudio, versions 4.1.1 and 1.0.153 RStudio Team, 2019. Linear mixed models were performed using: readxl (Wickham and Bryan, 2019), lme4 (Bates et al., 2015), lmerTest (Kuznetsova et al., 2017), cAIC (Säefken et al., 2018) and performance (Lüdecke et al., 2021).

3. Results

Since we did not have reliable temperature data for *in-situ* nests, analyses including temperature or incubation day as factors were not performed. Nevertheless, temperature records during incubation (46 days prior to documented emergence) were averaged for each nest type. The incubation temperature for *in-situ* nests was higher (2018: 33.5 ± 2.8 °C, 2019: 32.8 ± 1.6 °C, mean \pm SEM) than in *ex-situ* nests (2018: 30.5 ± 1.37 °C, 2019: 30.8 ± 0.6 °C, mean \pm SEM). In accordance, the female:male proportion was biased (49/67 females, 17/67 males *in-situ* and 4/67 females, 59/67 males *ex-situ*). This bias was different between years, in 2018 9/27 females and 17/27 males were identified for *in-situ* nests. In 2019, 40/40 females were observed for *in-situ* nests, while 1/40 females and 39/40 males were identified for *ex-situ* nests.

Results for 2018 showed an effect of *ex-situ* conservation for the following variables: body mass $F_{(1,16)} = 16.3$, $p < 0.001$; spleen-somatic index $F_{(1,16)} = 15.4$, $p = 0.001$; PALS length $F_{(1,12.2)} = 50.6$, $p < 0.001$; Heterophils $F_{(1,16)} = 6.2$, $p < 0.024$. No effect of sex was observed for any variable. Similarly, interactions between sex and condition were not significant (Supplementary Table 1).

To evaluate the combined effect of *in-situ* vs. *ex-situ* nests and sex on the variables, they were integrated into linear mixed models for both years. There was no effect of sex on body size or immune configuration, nor an interaction between *in-situ* vs. *ex-situ* condition with sex. The models incorporating both explanatory variables (*in-situ* vs. *ex-situ* condition and sex) better explained body mass and length, PALS length, heterophils and monocytes (42%, 24%, 16%, 6% and 6% of the data variance, respectively), while a model only including the *in-situ* vs. *ex-situ* condition better explained splenic-somatic index (21%). The best fitting model explaining PALS density included *in-situ* vs. *ex-situ* nests, sex and their interaction (23%. Table 1). The models showed that turtles from *ex-situ* nests had a greater body mass (Fig. 1A) and length (Fig. 1B), increased splenic mass normalized to body mass (Fig. 1C), as well as higher PALS density (Fig. 1D-F). Additionally, *ex-situ* hatchlings showed a higher number of heterophils (Fig. 1H) and decreased number of monocytes (Fig. 1J) compared to *in-situ* hatchlings. PALS length and number of lymphocytes did not show significant differences between conditions (Fig. 1G and I). The analyses showed that *ex-situ* nests had higher hatching ($\chi^2 = 11.8$, $p < 0.001$) and emergence success ($\chi^2 = 124.5$, $p < 0.001$) than *in-situ* nests (Supplementary Table 2).

4. Discussion

The main objective of this study was to evaluate the effect of *ex-situ* conservation in rookeries on the immune configuration, body size or hatching and emergence success in sea turtle offspring. Hatchlings from

Table 1

Summary of the best linear mixed effect models selected by cAIC, that explain developmental parameters in *Lepidochelys olivacea* hatchlings from *ex-situ* nests.

Response variables	β (SE)	df	F	p	R^2
Body mass					0.42
Intercept	16.43 (0.26)	51.17	27.1	<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	-2.18 (0.42)	124.48	0.05	<0.001	
Sex	-0.07 (0.33)			0.827	
Body length					0.24
Intercept	4.13 (0.03)	51.06	17.2	<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	-0.25 (0.06)	108.47	0.53	<0.001	
Sex	0.03 (0.05)			0.468	
Spleen-somatic index					0.21
Intercept	42.34 (2.29)	50.45	5.05	<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	-8.44 (3.76)	119.73	2.56	0.029	
Sex	-5.03 (3.14)			0.112	
PALS density					0.23
Intercept	216.65 (14.58)	43.09	9.12	<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	-96.98 (32.12)	48.89	2.23	0.004	
Sex	-106.65 (71.48)	49.06	2.93	0.142	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i> :Sex	134.08 (78.28)			0.093	
PALS length					0.16
Intercept	0.13 (0.01)	45.08	3.65	<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	-0.04 (0.02)	73.97	0.54	0.062	
Sex	-0.01 (0.01)			0.449	
Heterophils					0.06
Intercept	38.01 (1.69)	54.96	4.63	<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	-6.18 (2.87)	107.70	1.44	0.036	
Sex	3.10 (2.58)			0.233	
Lymphocytes					0.01
Intercept	49.10 (1.06)	60.25	0.63	<0.001	
Sex	1.29 (1.6)			0.429	
Monocytes					0.06
Intercept	12.07 (0.91)	55.8	6.50	<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	4.26 (1.67)	78.9	3.55	0.013	
Sex	-3.13 (1.66)			0.063	

cAIC: conditional Akaike information criteria, β (SE): regression coefficient (standard error), d.f.: degree of freedom calculated by Welch-Satterthwaite equation, F: F ratio, p: p value, R^2 : marginal coefficient of determination.

ex-situ nests showed greater splenic mass and PALS density, which are associated with a better immune response. Additionally, turtles from *ex-situ* nests showed a greater body size (mass and length), which is related to higher fitness as well as higher hatching and emergence success. Incubation temperatures were different between treatments and there was a clear bias in their sex ratio. However, the main variable explaining the differences was nest condition (*in-situ* vs *ex-situ*). There was no effect of sex nor an interaction between sex and condition for immunological and body size variables.

Temperatures inside *ex-situ* nests were colder than sand adjacent to *in-situ* sampled nests and differentially promoted the development of males. Temperature was not reliably measured for *in-situ* nests, since turtles did not survive in them. However, records from data loggers located in the same beach zone and close to the sampled nests were averaged. These records serve as a reference to explain the bias in female differentiation from *in-situ* nests, as well as the smaller hatchling size (body mass and length). Previous work has demonstrated that larger turtles (from colder nests) show better performance (faster emergence from nests, self-righting, crawling and swimming to the sea; Rivas et al., 2019; Fleming et al., 2021). This is consistent with an extended incubation period (Stubbs and Mitchell, 2018; Rivas et al., 2019). Interestingly, these effects were independent from sex, highlighting the importance of incubation temperature (not formally evaluated) to promote a better offspring phenotype (Freedberg et al., 2008).

Ex-situ conservation promoted spleen development, evidenced by a greater spleen-somatic index and higher PALS density. The reptilian spleen triggers the humoral defense, filters the blood and removes old erythrocytes (Kassab et al., 2009; Zhang et al., 2019). Indeed, antibody production declines in splenectomized lizards (Kanakambika and Muthukkaruppan, 1972; Hussein et al., 1979). Further, the reptilian

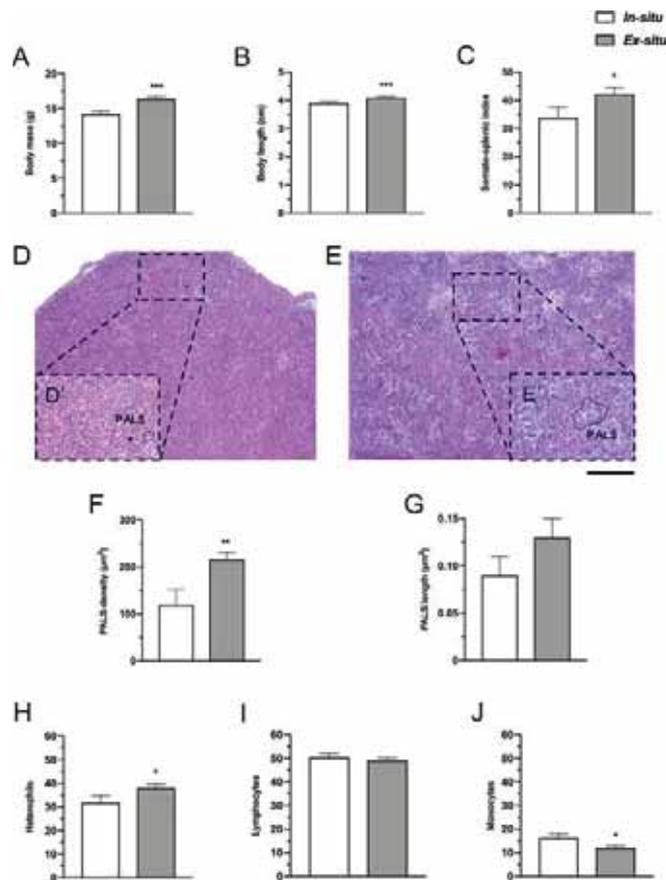


Fig. 1. Effect of *ex-situ* conservation on body size and immune variables in *Lepidochelys olivacea* hatchlings at nest emergence. Graphs showing the values obtained for *in-situ* ($n = 19$; white bars) and *ex-situ* ($n = 19$; gray bars) hatchlings during 2018 and 2019. A-C graphs showing body mass and length, as well as spleen-somatic index. D, E microphotographs of representative spleen sections stained with hematoxylin/eosin from *in-situ* and *ex-situ* hatchlings, respectively. D, E insets showing the unstructured splenic tissue from *in-situ* hatchlings and the visibly organized tissue in periarteriolar lymphoid sheaths (PALS) from *ex-situ* turtles at high magnification. F, G graphs showing the quantification of PALS density and length. H-J graphs showing leukocyte quantifications. All graphs show mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Scale bar for D, E = 200 μm and for D', E' = 50 μm .

spleen is the most important organ in the defense against extracellular bacteria (Zhang et al., 2016). In turtles, the mature spleen is segregated into white and red pulp mainly formed by leukocytes and erythrocytes, respectively (Neely and Flajnik, 2016). The white pulp contains PALS and peri-ellipsoid lymphoid sheaths (PELS) in their periphery (Neely and Flajnik, 2016). Presumably, PALS have central B lymphocytes and peripheral T cells surrounded by macrophages and dendritic cells (Zhang et al., 2019). In snakes and turtles, spleen size and cellularity show seasonal variation associated with environmental temperature, likely related to pathogen prevalence (Muñoz and De la Fuente, 2001; Tripathi and Singh, 2014). Interestingly, the results showed that spleen size and cytoarchitecture were higher in hatchlings from *ex-situ* nests. A potential link between lower incubation temperatures and spleen ontogeny should be studied.

Although the immune response of hatchlings from *in-situ* and *ex-situ* nests was not directly evaluated, splenic histology suggests that turtles from *ex-situ* nests have a potential to show a better immune response than hatchlings from *in-situ* nests (Hadidi et al., 2008; Mustafa and El-Desoky, 2020; Xu et al., 2020). This is supported by studies showing that diffuse erythrocyte/lymphocyte cytoarchitecture (not arranged in PALS-PALS) is related to earlier stages of splenic ontogeny and likely an

immature immune response (Zhang et al., 2019).

Ex-situ conservation was related to an increased number of heterophils and reduced number of monocytes. In reptiles, as in all vertebrates, heterophilia is associated with infections, tissue injury, necrosis and environmental stressors such as pollution and predation (Davis et al., 2008; Stacy et al., 2011). Recently, a study associated a higher number of heterophils and other inflammatory indicators with heat-induced stress in newly hatched sea turtles (Fleming et al., 2020). Moreover, the number of heterophils is associated with seasonal variation in turtles (Novovesky and Halan, 2019). Herein, a higher number of heterophils was observed in hatchlings from *ex-situ* nests incubated at colder temperatures. Since corticosterone concentration is similar between *in-situ* and *ex-situ* hatchlings (unpublished data), the higher number of heterophils is likely unrelated to stress. An intriguing possibility is that the higher number of heterophils in *ex-situ* turtles is associated with a better innate immune response, but this hypothesis was not evaluated. Since monocyte numbers change minimally with seasonal variation (Stacy et al., 2011), these leukocytes are likely not sensitive to temperature; but increase with antigenic stimulation (Stacy et al., 2011). The reduced monocytes in *ex-situ* hatchlings suggest that they were not challenged by pathogens.

The main variable explaining differences in body size and immune parameters was nest type (*in-situ* vs. *ex-situ*); even in same-sex hatchlings (data not shown). Some studies have evidenced a better immune response in males than females (e.g., Freedberg et al., 2008). However, in species with temperature-dependent sex determination the effects of temperature and sex on the immune response may be confounded. Studies in turtles with genetic sex determination have highlighted the relevance of incubation temperature to define the immune response independently from sex (Dang et al., 2015b).

Hatching and emergence success were higher in *ex-situ* nests, probably associated with better incubation conditions like cooler temperatures and higher humidity (Tezak et al., 2020). Both parameters are used as indicators of individual performance (Reboul et al., 2021). Thus, in the context of this study they contribute to explain the better incubation conditions in *ex-situ* nests.

5. Conclusion

The present results suggest that *ex-situ* conservation in hatcheries is associated with a better immune configuration and body condition. Moreover, *ex-situ* conservation is associated with higher hatching and emergence success, probably due to better incubation conditions.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Funding

This work was supported by the Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH to EM-H. LAR-A was Ph.D. fellow from CONACYT [grant number 701881].

Acknowledgements

The authors thank M.C. José Alejandro Marmolejo Valencia, M.C. Andrea Hernández Romero, Dra. Valentina Islas Villanueva, M.C. Samantha Karam Martínez, Dra. Elizabeth Labastida Estrada, M.V.Z. Rafael Villanueva Alcazar, Biol. Erika Peralta Buendía, Biol. María Teresa Luna and the staff who works in the hatchery "La Tortugueta Feliz" for their valuable technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111130>.

References

- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Bao, H.J., Li, M.Y., Wang, J., Qin, J.H., Xu, C.S., Hei, N.N., Yang, P., Gandahi, J.A., Chen, Q.S., 2009. Architecture of the blood-spleen barrier in the soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Anat. Rec.* 292, 1079–1087. <https://doi.org/10.1002/ar.20917>.
- Brown, G.P., Shine, R., 2016. Maternal body size influences offspring immune configuration in an oviparous snake. *R. Soc. Open Sci.* 3 <https://doi.org/10.1098/rsos.160041>.
- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A.R., Morgan, E.R., Murray, K., Pascoe, E.L., Sait, S.M., Wilson, A.J., Booth, M., 2017. Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372 <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0088>.
- Corbin, E., Vicente, J., Martín-Hernando, M.P., Acevedo, P., Pérez-Rodríguez, L., Gortazar, C., 2008. Spleen mass as a measure of immune strength in mammals. *Mammal Rev.* 38, 108–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2007.00112.x>.
- Dang, W., Lu, H., Gao, Y., Xu, N., Qu, T., Liu, Y., 2015a. Molecular analysis of inducible heat shock protein 70 of *Pelodiscus sinensis* and its effects during pathogen (*Aeromonas hydrophila*) infection. *Aquaculture* 442, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.030>.
- Dang, W., Zhang, W., Du, W.G., 2015b. Incubation temperature affects the immune function of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Sci. Rep.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep10594>.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760–772.
- Fleming, K.A., Perrault, J.R., Stacy, N.I., Copenrath, 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. *Conserv. Physiol.* 8, 1–17. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa046>.
- Freedberg, S., Greives, T.J., Ewert, M.A., Demas, G.E., Beecher, N., Nelson, C.E., 2008. Incubation environment affects immune system development in a turtle with environmental sex determination. *J. Herpetol.* 42, 536–541. <https://doi.org/10.1670/07-133.1>.
- Hadidi, S., Glenney, G.W., Welch, T.J., Silverstein, J.T., Wiens, G.D., 2008. Spleen size predicts resistance of rainbow trout to *Flavobacterium psychrophilum* challenge. *J. Immunol.* 180, 4156–4165. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4156>.
- Herrera-Vargas, M.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. *Front. Mar. Sci.* 4, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00400>.
- Hoh, D.Z., Lin, Y.F., Liu, W.A., Sidique, S.N.M., Tsai, L.J., 2020. Nest microbiota and pathogen abundance in sea turtle hatcheries. *Fungal Ecol.* 47, 100964 <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100964>.
- Hussein, M.F., Badir, N., El Ridí, R., El Deeb, S., 1979. Effect of seasonal variation on immune system of the lizard, *Scincus scincus*. *J. Exp. Zool.* 209, 91–96. <https://doi.org/10.1002/jez.1402090111>.
- IUCN, 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2. <https://www.iucnredlist.org> (Downloaded on 13 September 2021).
- Kanakambika, P., Muthukkaruppan, V., 1972. Immunological competence in the newly hatched lizard, *Calotes versicolor*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140, 21–23. <https://doi.org/10.3181/00379727-140-36387>.
- Kassab, A., Shousha, S., Fargani, A., 2009. Morphology of blood cells, liver and spleen of the desert tortoise (*Testudo graeca*). *Open Anat. J.* 1, 1–10. <https://doi.org/10.2174/1877609400901010001>.
- Keller, J.M., Balazs, G.H., Nilsen, F., Rice, M., Work, T.M., Jensen, B.A., 2014. Investigating the potential role of persistent organic pollutants in Hawaiian green sea turtle fibropapillomatosis. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7807–7816. <https://doi.org/10.1021/es5014054>.
- Kobayashi, S., Wada, M., Fujimoto, R., Kumazawa, Y., Arai, K., Watanabe, G., Saito, T., 2017. The effects of nest incubation temperature on embryos and hatchlings of the loggerhead sea turtle: implications of sex difference for survival rates during early life stages. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 486, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.10.020>.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H.B., 2017. lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *J. Stat. Softw.* 82, 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>.
- Lu, H., Jin, J., Fan, H., Dang, W., 2021. The magnitude of incubation temperature fluctuation affects the immunity of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) hatchlings. *Aquac. Res.* 1–10 <https://doi.org/10.1111/are.15391>.
- Lüdecke, D., Ben-Shachar, M.S., Patil, I., Waggoner, P., Makowski, D., 2021. Performance: an R package for assessment, comparison and testing of statistical models. *J. Open Source Softw.* 6, 3139. <https://doi.org/10.21105/joss.03139>.
- Mainwaring, M.C., Barber, I., Deeming, D.C., Pike, D.A., Roznik, E.A., Hartley, I.R., 2016. Climate change and nesting behaviour in vertebrates: a review of the ecological threats and potential for adaptive responses. *Biol. Rev.* 92, 1991–2002. <https://doi.org/10.1111/brv.12317>.
- Mashkour, N., Jones, K., Kophamel, S., Hipolito, T., Ahasan, S., Walker, G., Jakob-Hoff, R., Whittaker, M., Hamann, M., Bell, I., Elliman, J., Owens, L., Saladin, C., Crespo-Picazo, J.L., Gardner, B., Loganathan, A.L., Bowater, R., Young, E., Robinson, D., Baverstock, W., Blyde, D., March, D., Eghbali, M., Mohammadi, M., Freggi, D., Giliam, J., Hale, M., Nicolle, N., Spiby, K., Wrobel, D., Parga, M., Mobaraki, A., Rajakaruna, R., Hyland, K.P., Read, M., Ariel, E., 2020. Disease risk analysis in sea turtles: a baseline study to inform conservation efforts. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230760>.
- Muñoz, F.J., De la Fuente, M., 2001. The effect of the seasonal cycle on the splenic leukocyte functions in the turtle *Mauremys caspica*. *Physiol. Biochem. Zool.* 74, 660–667.
- Muñoz, F.A., Estrada-Parra, S., Romero-Rojas, A., Gonzalez-Ballesteros, E., Work, T.M., Villaseñor-Gaona, H., Estrada-García, I., 2013. Immunological evaluation of captive Green Sea turtle (*Chelonia Mydas*) with ulcerative dermatitis. *J. Zoo Wildl. Med.* 44, 837–844. <https://doi.org/10.1638/2010-0228r4.1>.
- Mustafa, F.E.Z.A., El-Desoky, S.M.M., 2020. Architecture and cellular composition of the spleen in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Microsc. Microanal.* 26, 589–598. <https://doi.org/10.1017/S143192762000152X>.
- Neely, H.R., Flajnik, M.F., 2016. Emergence and evolution of secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 693–711. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125306>.
- Novoveský, E., Halán, M., 2019. Observation of seasonal changes of selected hematological parameters in *Trachemys* spp. *Folia.* 63, 46–53.
- Pace, A., Rinaldi, L., Ianniello, D., Borrelli, L., Cringoli, G., Fioretti, A., Hochscheid, S., Dipineto, L., 2019. Gastrointestinal investigation of parasites and Enterobacteriaceae in loggerhead sea turtles from Italian coasts. *BMC Vet. Res.* 15, 370. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2113-4>.
- Palacios, M.G., Gangloff, E.J., Reding, D.M., Bronikowski, A.M., 2020. Genetic background and thermal environment differentially influence the ontogeny of immune components during early life in an ectothermic vertebrate. *J. Anim. Ecol.* 89, 1883–1894. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13271>.
- Perrault, J.R., Levin, M., Mott, C.R., Boverly, C.M., Brette, M.J., Chabot, R.M., Gregory, C.R., Guertin, J.R., Hirsch, S.E., Ritchie, B.W., Weege, S.T., Welsh, R.C., Witherington, B.E., Page-Karjian, A., 2021. Insights on immune function in free-ranging green sea turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomatosis. *Animals* 11, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ani11030861>.
- Read, T., Booth, D.T., Limpus, C.J., 2012. Effect of nest temperature on hatchling phenotype of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from two South Pacific rookeries, Mon Repos and la Roche Percée. *Aust. J. Zool.* 60, 402–411. <https://doi.org/10.1071/ZO12079>.
- Reboul, I., Booth, D., Rusli, U., 2021. Artificial and natural shade: implications for green turtle (*Chelonia mydas*) rookery management. *Ocean Coast. Manag.* 204, 105521 <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2021.105521>.
- Rivas, M.L., Esteban, N., Marco, A., 2019. Potential male leatherback hatchlings exhibit higher fitness which might balance sea turtle sex ratios in the face of climate change. *Clim. Chang.* 156 <https://doi.org/10.1007/s10584-019-02462-1>.
- Rousselet, E., Levin, M., Gebhard, E., Higgins, B.M., DeGuisse, S., Godard-Coding, C.A.J., 2013. Evaluation of immune functions in captive immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 156, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.004>.
- RStudio Team (2019). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (Accessed 1 July 2020).
- Säefken, B., Rügamer, D., Kneib, T., Greven, S., 2018. Conditional Model Selection in Mixed-Effects Models with caIC4. *arXiv e-print 1803.05664*.
- Sarmiento-Ramírez, J.M., Abella-Pérez, E., Phillott, A.D., Sim, J., Van West, P., Martín, M.P., Marco, A., Diéguez-Urbeondo, J., 2014. Global distribution of two fungal pathogens threatening endangered sea turtles. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085853>.
- Sposato, P., Keating, P., Lutz, L.P., Milton, S.L., 2021. Evaluation of immune function in two populations of green sea turtles (*Chelonia mydas*) in a degraded versus a nondegraded habitat. *J. Wildl. Dis.* 57, 761–772. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00204>.
- Stacy, N.I., Boylan, S., 2014. Clinical pathology of sea turtles. In: Mettee, N. (Ed.), *Clinical Pathology. Marine Turtle Trauma Response Procedures: A Veterinary Guide. WIDECASST Technical Report No. 17*. Accessed online 13 September 2021.
- Stacy, N.I., Alleman, A.R., Saylor, K.A., 2011. Diagnostic hematology of reptiles. *Clin. Lab. Med.* 31, 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.006>.
- Stacy, N.I., Pendl, H., Wencel, P.M., 2021. Reptiles and birds. In: Sharkey, L.C., Radin, M. J., Seelig, D. (Eds.), *Veterinary Cytology*. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp. 828–868. <https://doi.org/10.1002/9781119380559.ch61>.
- Stubbs, J.L., Mitchell, N.J., 2018. The influence of temperature on embryonic respiration, growth, and sex determination in a western Australian population of green turtles (*Chelonia mydas*). *Physiol. Biochem. Zool.* 91 <https://doi.org/10.1086/700433>.
- Tanabe, L.K., Steenacker, M., Rusli, M.U., Berumen, M.L., 2021. Implications of nest relocation for morphology and locomotor performance of green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings. *Ocean Coast. Manag.* 207, 105591 <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2021.105591>.
- 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, 939–951. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04643-7>.
- Tripathi, M.K., Singh, R., 2014. Seasonal variation and innate immune responses of spleen in fresh-water snake, *Natrix piscator*. *J. Physiol. Biochem.* 10, 292–300.

- Van De Merwe, J., Ibrahim, K., Whittier, J., 2005. Effects of hatchery shading and nest depth on the development and quality of *Chelonia mydas* hatchlings: implications for hatchery management in peninsular, Malaysia. *Aust. J. Zool.* 53, 205–211. <https://doi.org/10.1071/ZO03052>.
- Wickham, H., Bryan, J., 2019. readxl: Read Excel Files. R Package Version 1.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl> (accessed 28.12.20).
- Work, T.M., Balazs, G.H., Wolcott, M., Morris, R., 2003. Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. *Dis. Aquat. Org.* 53, 41–46. <https://doi.org/10.3354/dao053041>.
- Xu, M., Li, W., Yang, S., Sun, X., Tarique, I., Yang, P., Chen, Q., 2020. Morphological characterization of postembryonic development of blood-spleen barrier in duck. *Poult. Sci.* 99, 3823–3830. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.012>.
- 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>.
- Zhang, Q., Sun, X., Wang, T., Chen, B., Huang, Y., Chen, H., Chen, Q., 2019. The postembryonic development of the immunological barrier in the chicken spleens. *J Immunol Res* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6279360>.

IX. CAPÍTULO II.

La reubicación *ex-situ* sesga la determinación sexual en crías de tortuga marina preservando la función inmunitaria en condiciones basales

La reubicación *ex-situ* sesga la determinación sexual en crías de tortuga marina preservando la función inmunitaria en condiciones basales

Resumen

La reubicación de huevos en viveros (*ex-situ*) es una de las estrategias principalmente empleadas para conservar las poblaciones de tortugas marinas. Un trabajo previo realizado en crías de tortuga *Lepidochelys olivacea* demostró que la reubicación *ex-situ* promueve el desarrollo del bazo, e incrementa el número de heterófilos circulantes disminuyendo los monocitos. Sin embargo, hasta el momento no se sabe si en las tortugas marinas estos indicadores están asociados a una respuesta inmunitaria más eficiente. Para probar esta hipótesis, este trabajo evaluó el efecto de la reubicación en vivero sobre la función inmunitaria innata basal en crías provenientes de nidos *in-situ* (n=10) y nidos *ex-situ* (n=10). Las variables medidas en suero sanguíneo fueron: 1) actividad de la fosfatasa alcalina; 2) capacidad lítica del sistema del complemento; y 3) capacidad antioxidante-oxidante. Adicionalmente se cuantificó la expresión de las proteínas de choque térmico 70 (HSP70) y HSP90 y del receptor tipo toll (TLR) 4, a nivel de mRNA en bazo e hígado. Además, se determinó el sexo de todos los individuos. Los análisis histológicos revelaron que el 100% de las crías provenientes de los nidos *in-situ* fueron hembras, mientras el 98% de las crías de nidos *ex-situ* fueron machos. Los resultados mostraron que aún cuando la reubicación *ex-situ* sesgó la determinación sexual hacia machos, no alteró la actividad de la fosfatasa alcalina, la capacidad hemolítica del sistema del complemento ni la expresión de TLR4 en el bazo y el hígado. Sin

embargo, la capacidad antioxidante-oxidante en plasma sanguíneo y la expresión de las HSP70 y HSP90 mostraron una respuesta diferencial entre las condiciones de incubación. Esta respuesta diferencial podría contribuir a explicar la estabilidad de los parámetros inmunitarios medidos en condiciones basales en este trabajo. En estudios futuros se deberá evaluar directamente el impacto de la temperatura de incubación (y de otras variables abióticas que son diferentes entre las condiciones de incubación) sobre la respuesta inmunitaria basal y en individuos sometidos a un reto infeccioso.

Introducción

Seis de las siete especies de tortugas marinas existentes en el mundo, anidan y se alimentan en las costas mexicanas (Peñaflores y Márquez, 2016). De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, las poblaciones de estas especies se encuentran en disminución continua, ya que siguen siendo amenazadas (IUCN, 2021). Las principales causas de esa disminución poblacional son debido a 1) perturbaciones antropogénicas (ej. contaminación, pesca incidental, saqueo de huevos en playa, tráfico y comercio de sus productos, entre otras. Eckert, 2000); 2) incremento de la temperatura ambiental (Maulany *et al.*, 2012a; Jensen *et al.*, 2018; Staines *et al.*, 2019); y 3) la incidencia de enfermedades emergentes (Work *et al.*, 2001, 2019; Mashkour *et al.*, 2020). La mayor parte de las enfermedades infecciosas reportadas son causadas por parásitos (Cable *et al.*, 2017), bacterias (Muñoz *et al.*, 2013), hongos (Gleason *et al.*, 2020) y virus (Perrault *et al.*, 2021). Sin embargo, la sola presencia de los microorganismos no asegura la infección, ya que éstos pueden encontrarse incluso en individuos clínicamente sanos (Hoh *et al.*, 2020; Mashkour *et al.*, 2020). Así, muy probablemente la respuesta diferencial de los organismos ante los retos infecciosos pueda ser atribuida a la inmunocompetencia individual (Machado *et al.*, 2013).

Se ha propuesto que en organismos ectotermos la inmunocompetencia es configurada desde etapas tempranas del desarrollo por factores como: temperatura (Li *et al.*, 2013), humedad (Brown y Shine, 2018) y el efecto materno (ej. tamaño corporal, reserva de nutrientes en huevo, genética) (Booth *et al.*, 2013; Brown y Shine, 2018).

La temperatura de incubación es uno de los factores que se han relacionado

consistentemente con la determinación de la inmunocompetencia en reptiles. En tortugas, la temperatura óptima de incubación es específica de la especie y fuera de estos rangos óptimos la inmunocompetencia decae (Les *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2021). Debido a que la temperatura de incubación determina el sexo en muchas especies de reptiles, incluyendo a las tortugas marinas, a menudo es difícil separar el efecto del sexo de aquél de la temperatura *per se* sobre la inmunocompetencia (Paitz *et al.*, 2010; Zimmerman, 2018). Sin embargo, estudios en tortugas dulceacuícolas en las cuales el sexo es determinado genéticamente, ponen de manifiesto el relevante papel que juega la temperatura de incubación sobre el desarrollo temprano de la inmunocompetencia (Dang *et al.*, 2015a).

Una de las estrategias de conservación principalmente empleadas en todo el mundo es la reubicación *ex-situ* de nidos de tortuga marina en viveros (Mortimer, 2000). Esta estrategia ha incrementado el número de crías emergidas al mitigar el robo de huevos en playa, la depredación animal y las contingencias ambientales como inundaciones o sequías (Tuttle y Rostal, 2010; Rivas *et al.*, 2019). Sin embargo, la reubicación *ex-situ* a menudo sesga la proporción sexual de las crías y modifica el éxito de emergencia y eclosión (Merwe *et al.*, 2005; Maulany *et al.*, 2012b; Robledo-Avila *et al.*, 2022). Además, esta estrategia promueve efectos negativos sobre el desarrollo del cerebro, gónadas y sistema locomotor (Sönmez *et al.*, 2011; Herrera-Vargas *et al.*, 2017; Unda-Díaz *et al.*, 2022). Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible determinar el efecto de la temperatura de incubación sobre el fenotipo diferencial de las crías a la emergencia (Unda-Díaz *et al.*, 2022).

Recientemente, se ha relacionado la reubicación de huevos en viveros con alteraciones en la configuración inmunitaria de las crías de tortuga marina a la

emergencia del nido (Robledo-Avila *et al.*, 2022). Específicamente, la conservación *ex-situ* ha sido asociada con el desarrollo adelantado del bazo, caracterizado por un mayor índice somato-esplénico y una mayor densidad de agregados linfoides periarteriolares (PALS), así como un incremento en los heterófilos circulantes y un decremento en los monocitos (Robledo-Avila *et al.*, 2022). La relevancia de estos cambios para la supervivencia de las tortugas incubadas en nidos *ex-situ* no ha sido evaluada. Sin embargo, el hecho que el bazo sea el principal órgano linfoide de los reptiles, el cual determina la respuesta humoral (Kanakambika y Muthukkaruppan, 1972; Hussein *et al.*, 1979), la defensa contra las bacterias, así como el filtrado de la sangre y la renovación de eritrocitos (Kassab *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2019), sugiere que estos cambios podrían tener una implicación funcional para la inmunocompetencia de las crías incubadas en nidos *ex-situ*. Esta idea es apoyada por un estudio previo que relaciona el incremento en el número y definición de PALS y PELS con la maduración de la respuesta humoral y la producción de anticuerpos (Zhang *et al.*, 2019). Al mismo tiempo, el incremento en el número de heterófilos y la disminución de monocitos circulantes sugiere que las tortugas marinas provenientes de los nidos reubicados podrían presentar una respuesta inmunitaria basal diferencial (Robledo-Avila *et al.*, 2022).

El sistema inmunitario de los reptiles es similar al del resto de los vertebrados, integrado por componentes celulares y humorales que los defienden de agentes extraños, y es capaz de diferenciar lo propio de lo extraño (Zimmerman *et al.*, 2010). Se ha descrito que la respuesta innata de los reptiles es muy robusta, de acción rápida y de corta memoria (Rios y Zimmerman, 2015). Dentro de sus principales componentes humorales se encuentran las proteínas sanguíneas como las

enzimas, los factores del sistema complemento (Zimmerman, 2020) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Sies *et al.*, 2017). Estos componentes son dependientes de la temperatura en ectotermos (Merchant *et al.*, 2012), siendo más eficiente su acción dentro de rangos óptimos específicos de la especie. Además, se ha descrito que su actividad es sensible a la temperatura de incubación (Dang *et al.*, 2015a; Yektaseresht *et al.*, 2016).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la estrategia de conservación *ex-situ* sobre la respuesta innata, en el presente trabajo se analizaron tres parámetros: 1) la actividad de la fosfatasa alcalina; 2) la capacidad lítica del sistema del complemento; y 3) la actividad antioxidante-oxidante bajo condiciones basales en crías de tortuga *Lepidochelys olivacea* a la emergencia del nido de la playa de la Escobilla, Oaxaca. Adicionalmente, se cuantificó la expresión de las proteínas de choque térmico 70 (HSP70) y HSP90 en bazo e hígado como indicadores de estrés por temperatura, y la expresión del receptor tipo toll (TLR) 4, a nivel de mRNA. Todos los individuos fueron sexados.

Metodología

El sitio de estudio del presente trabajo fue el Santuario Playa de la Escobilla en Oaxaca (15° 47,1' N, 96° 44.3' O; Figura 1); donde se resguardaron nidos *in-situ* (n=10) y nidos *ex-situ* (n=10) durante la 4a arribada, entre los meses de octubre a diciembre del año 2019. Se colectaron cuatro crías por nido, con un total de 40 crías por condición bajo el permiso de colecta SGPA/DGVS/9040/19. De esta manera, a finales del mes de octubre se comenzó a patrullar la playa a partir del tercer día de arribada y hasta el día cinco, cubriendo un área de 11,250 m². Se seleccionaron de manera aleatoria a las tortugas anidantes listas para desovar y se procedió a marcar los nidos *in-situ* mediante el método de triangulación (Ávila y Meraz, 2008). Se contabilizaron los huevos que fueron depositados por la tortuga anidante y a la cuenta del huevo número 20 se colocó un sensor de temperatura (Onset HOBO® Bluetooth Pendant MX2200 and UA-002-64; accuracy +/- 0.2 °C) a una profundidad aproximada de 35 cm (Merwe *et al.*, 2005). Estos sensores fueron programados para el monitoreo de temperatura cada hora durante el periodo de incubación.

La reubicación de los nidos *ex-situ* fue llevada a cabo por el personal del Centro Ecoturístico La Escobilla, siguiendo los protocolos establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-162-SEMARNAT-2012). Una vez identificada la tortuga anidante se procedió a retirar los huevos del nido antes de que esta los cubriera con arena. Los huevos fueron colocados en bolsas de algodón de malla previamente marcadas para su traslado con el mínimo movimiento de rotación o agitación. Las nidadas fueron transportadas al vivero La Escobilla y sembradas en nidos previamente contruidos (NOM-162-SEMARNAT-2012). Se colocó un sensor de temperatura como se ha descrito previamente y al finalizar el nido fue cubierto con arena y

marcado. En conjunto, se colocaron 12 sensores de temperatura *in-situ* y 12 sensores *ex-situ*. Sin embargo, los nidos *in-situ* marcados no fueron exitosos. De esta manera, al día 42 de incubación, se procedió a identificar nidos cercanos a los sensores previamente colocados *in-situ*, para evaluarlos al momento de la emergencia (ej. día 45 de incubación).

Se seleccionaron las primeras cuatro crías de cada nido, tan pronto como alcanzaron la superficie de la arena las crías fueron eutanasiadas por decapitación (NOM-033-ZOO-1995. Herrera-Vargas *et al.*, 2017; Robledo-Avila *et al.*, 2022). De todos los individuos se colectó una muestra de sangre completa en microtubos con heparina de litio (300-500 μ l), la cual se mantuvo a 4 °C. Posteriormente las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2,500 rpm durante 15 min para la obtención de plasma sanguíneo. Se obtuvo una muestra de bazo y de hígado de la primera cría de cada nido. Estas muestras fueron incubadas en solución estabilizadora (RNAlater, ThermoFisher). Las gónadas de todas las crías fueron extraídas y se almacenaron en formalina al 10% para posteriores análisis histológicos y la determinación sexual (Robledo-Avila *et al.*, 2022). Las muestras de plasma sanguíneo y de bazo e hígado fueron transportadas en nitrógeno líquido hasta el laboratorio de Ecofisiología Animal del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA-UMSNH), donde fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

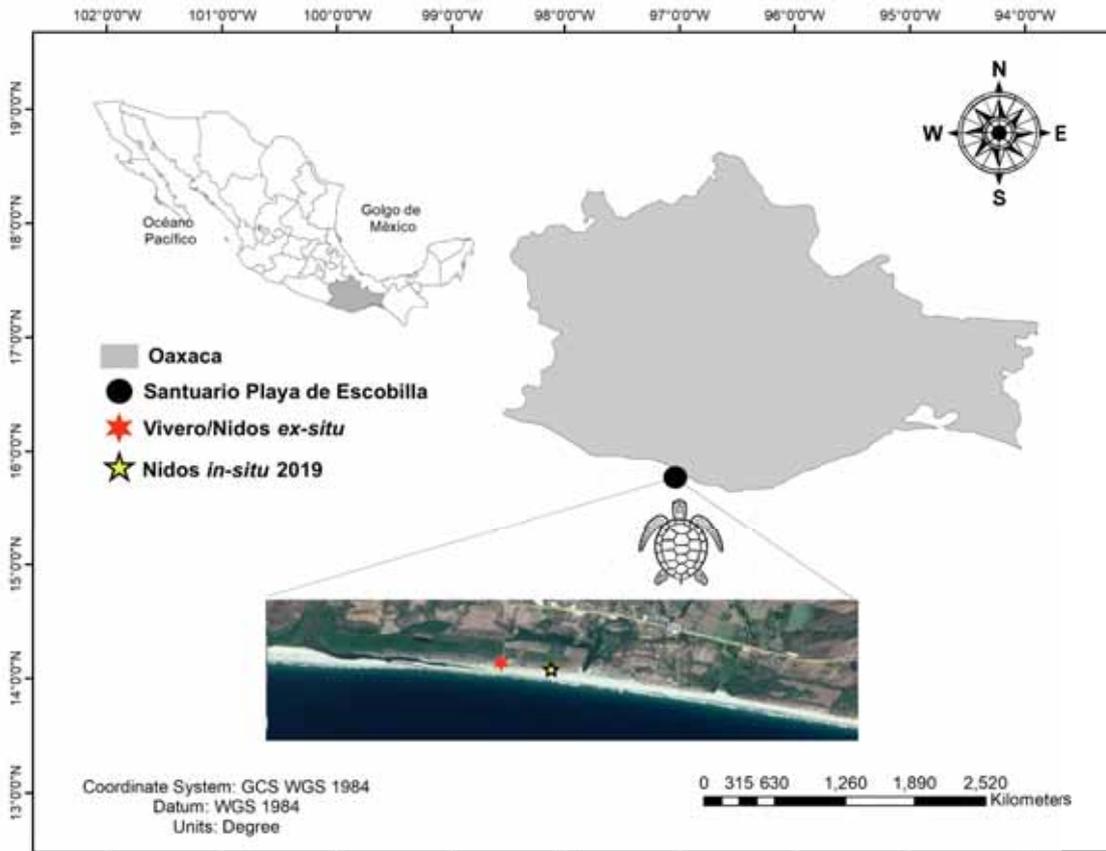


Figura 1. Mapa del sitio de estudio en el Santuario Playa de Escobilla Oaxaca. En la imagen se observa la ubicación espacial del sitio de muestreo (círculo negro). El sitio de monitoreo y colecta en playa para los nidos *in-situ* (estrella amarilla) estuvo localizado a una distancia de 350 metros del vivero, donde fueron reubicados los nidos *ex-situ* (estrella roja).

Actividad de la fosfatasa alcalina

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina se determinó siguiendo protocolos previamente establecidos y modificados por Bergmeyer *et al.* (1974) y Walter y Schütt (1974). En breve, se incubaron 10 µl de plasma sanguíneo con 1,000 µl de buffer de fosfatos con carbonato (30 mM, pH 9.8) a 37° C. La actividad de la enzima se midió en tiempo real en espectrofotómetro CARYWIN® a 407 nm durante seis minutos cada 50 segundos. Todo lo anterior se realizó por triplicado para cada muestra. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976), realizado por duplicado (iMark™ Absorbance Microplate Reader, Biorad). El valor real de la actividad específica de la enzima se obtuvo a partir de la lectura de la absorbancia y la cuantificación de proteínas correspondientes para cada individuo, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades/mg proteína soluble} = \frac{\text{Unidades/ml}}{\text{mg proteína soluble/ml}}$$

Capacidad hemolítica del complemento

El ensayo de la actividad hemolítica del complemento se realizó siguiendo protocolos descritos en animales silvestres (Merchant *et al.*, 2015; Moleón *et al.*, 2020). Para ello, se obtuvo 1 ml de sangre completa de borrego mediante jeringa estéril con aguja de 20G, y se almacenó en un tubo BD Vacutainer K₂EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Posteriormente se tomaron 200 µl de la muestra y se realizaron tres lavados con 3 ml de solución salina al 0.9% seguidos de centrifugación a 2,500 rpm, a temperatura ambiente. La pastilla resultante fue resuspendida en 2.5 ml de solución salina para obtener una concentración final de

eritrocitos de borrego (SRBC) al 5%. Se mezcló 1 ml de esta solución con 2.5 ml de solución salina para obtener una solución de SRBC al 2% (Merchant *et al.*, 2015). Para determinar el volumen de plasma necesario para lisar al menos el 50% de los SRBC, se realizó un ensayo de hemólisis dependiente de volumen, modificado de Baker y Merchant, 2018. En breve, se incubaron 2, 4, 6, 8, 10 y 12 μ l de plasma de tortuga, completando un volumen final de 200 μ l con buffer de dextrose-gelatina (Veronal, BioWhittaker, Walkersville, MD), adicionando 150 μ l de SRBC al 2% durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 2,500 x g durante 3 min a temperatura ambiente y se recuperaron 150 μ l de sobrenadante, los cuales fueron transferidos a una placa de 96 pozos para su lectura en el espectrofotómetro (Varioskan™ LUX multimode microplate reader) a una absorbancia de 540 nm. Todas las muestras sanguíneas se analizaron por duplicado, y los resultados se expresaron como el porcentaje máximo de hemólisis. Se utilizaron dos controles: uno negativo (0% lisis), el cual incluyó 150 μ l de Veronal + 150 μ l de SRBC al 2%; y uno positivo (100% lisis), el cual incluyó 150 μ l agua destilada + 150 μ l de SRBC al 2% lisados mecánicamente con aguja de 30G y jeringa de tuberculina (10 eyecciones). El control positivo fue verificado mediante el conteo de eritrocitos en cámara Neubauer a una magnificación de 400X (Merchant *et al.*, 2012; Moleón *et al.*, 2020). Para obtener el porcentaje de lisis de SRBC, fue considerada la lectura de absorbancia del control positivo como el 100% de lisis. Posteriormente se obtuvo el valor real del porcentaje de lisis por individuo. A continuación, se muestra un ejemplo del procedimiento descrito anteriormente.

$$\begin{aligned}
 \text{Absorbancia de control positivo (0.457)} &= 100\% \\
 \text{Absorbancia de muestra "Z" (0.143)} &= X \\
 \frac{(0.143) * (100)}{0.457} &= 31.3\% \\
 X &= 31.3\% \text{ de lisis de SRBC de la muestra "Z"}
 \end{aligned}$$

Actividad antioxidante-oxidante

Se realizaron ensayos colorimétricos para evaluar la capacidad antioxidante total (TAC, por sus siglas en inglés), de la Superóxido Dismutasa (SOD), así como del Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) en el plasma sanguíneo de las crías de *L. olivacea*. La actividad de cada compuesto se determinó mediante kits comerciales (TAC: BioVision K274-100; SOD: SIGMA-ALDRICH 19160-1KT-F; H₂O₂: Thermo Fisher Scientific A22188) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y protocolos modificados por Martínez-Lendech *et al.* (2018).

Ensayos de expresión de proteínas de choque térmico y del receptor tipo Toll

Se llevó a cabo la purificación de ARN del bazo e hígado de cada cría con TRIzol™ Reagent de Invitrogen como lo indica el fabricante. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con 100 ng/ μl de ARN total mediante el iScript™ ADNc Synthesis Kit de BioRad como lo indica el fabricante. Los oligonucleótidos sentido y antisentido para amplificar las secuencias de interés fueron sintetizados por T4Oligo (Tabla 1). La cuantificación de la expresión fue realizada mediante RT-PCR con iTaq Universal SYBR Green Supermix en Termociclador BioRad CX2000, empleando 250 ng/ μl de ADNc para todas las reacciones. La pureza del ARN y ADNc se evaluó en NanoDrop™ One (ND-ONE-W; Thermo Scientific). La expresión relativa de los genes de interés (HSP70, HSP90 y TLR4) fue comparada mediante 2^{-ΔΔCt} con

respecto al gen de referencia r18S, normalizando los datos a la condición control (*in-situ*). Se realizaron dos ensayos independientes para bazo y para hígado.

Tabla 1. Cebadores usados para RT-qPCR, diseñados a partir de referencias de *Caretta caretta*^a y *Chelonia mydas*^b.

Gen	Secuencia (5'-3')
r18S^a	GCTAATACATGCCGACGAG GGCCCGAGGTTATCTAGAG
HSP90^a	GGATACTGGCATAGGGATG CAACACCAAACACTGACCAATC
HSP70^a	TCTCCGTACAGCTTGTGAAC CCACGGAACAGATCAGC
TLR4 x1^b	TCACTTATGGTTCTCTCCACCG GGGAACTCCAGAGAGGTTCAA

^aTedeschi *et al.*, (2015)

^bNCBI

Análisis estadístico

Los resultados de la respuesta innata (actividad de la fosfatasa alcalina, capacidad hemolítica y antioxidante-oxidante), así como la expresión de las HSP y del TLR4, fueron comparados entre los nidos *in-situ* (n=10) y los nidos *ex-situ* (n=10).

La actividad de la fosfatasa alcalina y de la SOD fueron comparadas mediante modelos lineales mixtos (LMM, por sus siglas en inglés); mientras la capacidad hemolítica, la TAC y la actividad del H₂O₂, fueron analizadas mediante modelos lineales mixtos generalizados (GLMM, por sus siglas en inglés) con distribución quasi-Poisson (capacidad hemolítica, TAC y H₂O₂). Los modelos incluyeron como efecto fijo al tratamiento (*in-situ* vs *ex-situ*) y como efecto aleatorio a las crías de cada nido (debido a su jerarquización). El efecto del factor fijo en los LMM fue comparado mediante análisis de varianza, mientras el efecto del factor fijo en los GLMM fue estimado usando la prueba de Chi² Wald tipo II. El efecto del modelo se

determinó a partir de R^2 marginal, como medida de proporción que explica la varianza por el modelo seleccionado; tomando en cuenta un nivel de significancia de 0.05. Los datos en crudo de las variables analizadas fueron graficados en el software GraphPad Prism Versión 84.0.

Se evaluó la normalidad de los datos de todas las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk, así como la homocedasticidad de los modelos seleccionados. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa R (R Core Team, 2020) y RStudio (versión 1.0.153). Los modelos lineales mixtos fueron realizados utilizando: readxl (Wickham and Bryan, 2019), lme4 (Bates *et al.*, 2014), lmerTest (Kuznetsova *et al.*, 2017).

Resultados

Temperatura de la arena de los nidos

Aunque los registros de la temperatura no fueron incluidos en los análisis debido a que las crías de los nidos *in-situ* previamente marcados no emergieron, la temperatura fue promediada para cada condición de incubación y se presentan como referencia. Los nidos *in-situ* presentaron una temperatura promedio de 32.8 ± 0.05 °C, error estándar (MÍNIMA= 28.7 °C - MÁXIMA= 34.8 °C), mientras los nidos *ex-situ* presentaron un promedio de 30.8 ± 0.02 °C, error estándar (MÍNIMA= 29.3 °C - MÁXIMA= 32.0 °C). Los nidos *in-situ* promovieron el desarrollo de hembras (40/40), mientras que los nidos *ex-situ* favorecieron la diferenciación de machos (39/40).

Actividad de la fosfatasa alcalina

Los resultados mostraron que los niveles de actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en tortugas marinas a la emergencia de nidos *ex-situ* (0.0518 ± 0.007 mU/mg proteína, promedio \pm error estándar) no son diferentes de aquéllos registrados en crías provenientes de nidos *in-situ* (0.0646 ± 0.007 mU/mg proteína, promedio \pm error estándar; $p > 0.05$. Figura 2A y Tabla 2).

Capacidad hemolítica del complemento

De manera semejante, la capacidad de hemólisis de las proteínas del complemento no mostró diferencias entre las crías provenientes de nidos *ex-situ* (16.25 ± 0.95 %) y las crías de nidos *in-situ* (20.5 ± 2.35 %). Figura 2B y Tabla 3.

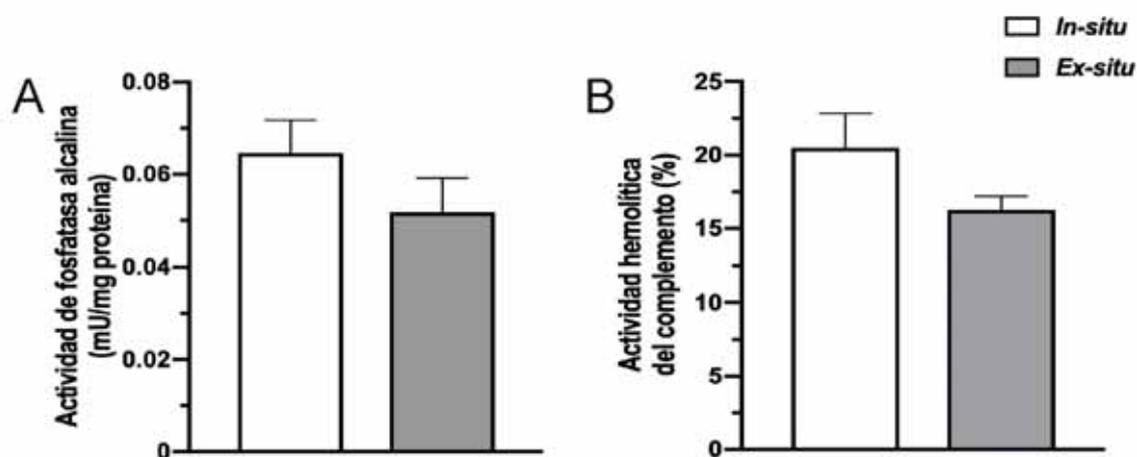


Figura 2. Efecto de la reubicación de nidos *ex-situ* sobre la actividad de la fosfatasa alcalina y la capacidad hemolítica del complemento en crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido. El gráfico **A** muestra la actividad específica de la fosfatasa alcalina (mU/mg de proteína) y el gráfico **B** muestra el porcentaje de actividad máxima de lisis del sistema del complemento en el plasma sanguíneo de las crías provenientes de nidos *in-situ* y *ex-situ* bajo condiciones basales. Los resultados son presentados como promedios \pm error estándar, $p > 0.05$.

Capacidad antioxidante-oxidante

Respecto a la capacidad antioxidante, la actividad de la SOD no mostró diferencias entre las dos condiciones de incubación (*in-situ* = 28.78 ± 3.98 %; *ex-situ* = 34.44 ± 2.32 %) (Figura 3A y Tabla 2); mientras que la TAC presentada por las tortugas incubadas en nidos *ex-situ* fue significativamente menor que la observada en tortugas provenientes de nidos *in-situ* ($\text{Chi}^2 = 8.0725$, $p < 0.01$) (Figura 3B y Tabla 3). La actividad del H_2O_2 fue menor en tortugas incubadas en nidos *ex-situ* en comparación con la que se observó en las tortugas incubadas *in-situ* ($\text{Chi}^2 = 26.995$, $p < 0.001$) (Figura 3C y Tabla 3).

Tabla 2. Resumen de resultados de los modelos de efectos lineales mixtos de los parámetros de actividad de fosfatasas alcalinas y actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) de las crías de *Lepidochelys olivacea* de nidos *ex-situ*.

Variable respuesta	β (SE)	df	F	p	R ²
Actividad de fosfatasas alcalinas					0.02
Intercepto	6.709 (0.39)			<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	-0.149 (0.57)	18.34	-0.26	0.796	
Actividad de SOD					0.01
Intercepto	34.457 (3.37)			<0.001	
<i>In-situ</i> vs. <i>ex-situ</i>	-3.594 (5.19)	16.95	-0.69	0.498	

β (SE): coeficiente de regresión (error estándar), d.f.: grados de libertad Welch-Satterthwaite, F: radio de F, p: valor de p, R²: coeficiente marginal de determinación.

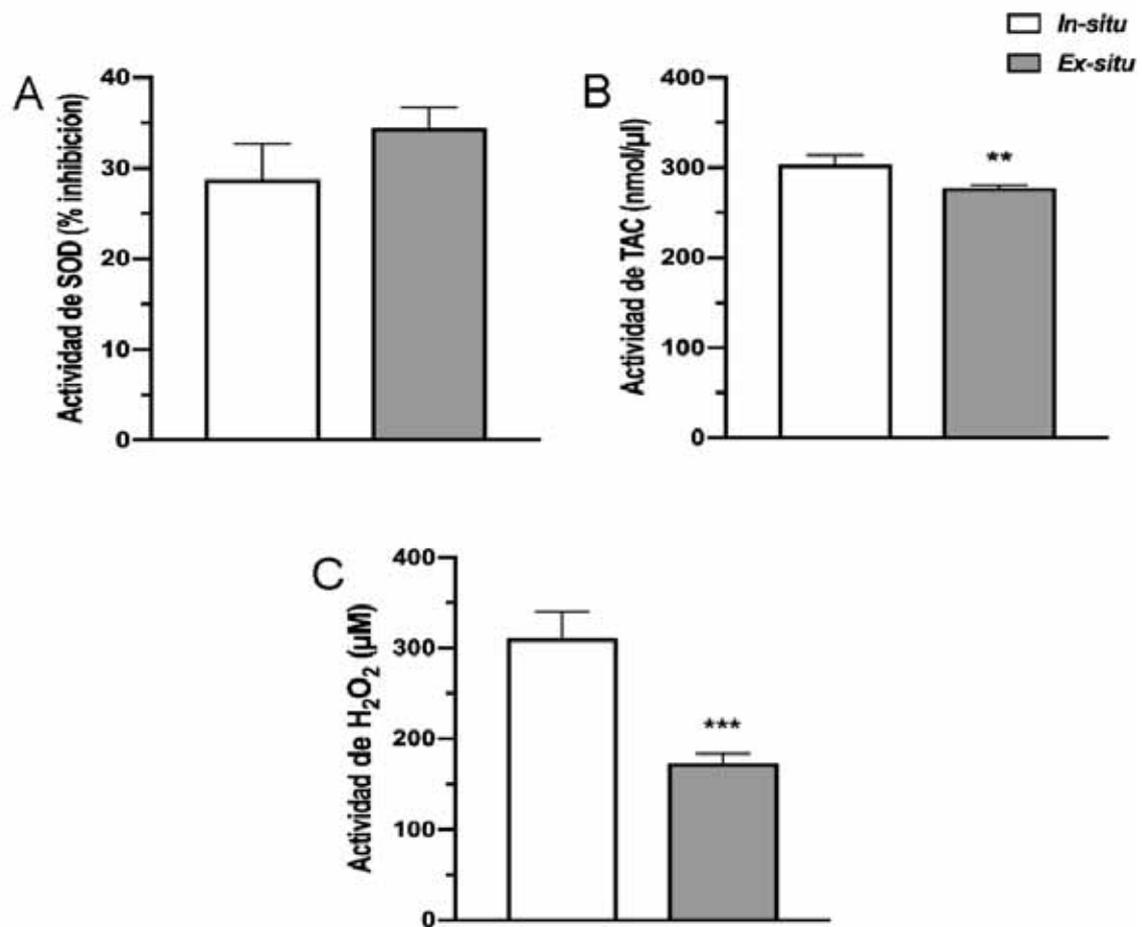


Figura 3. Capacidad antioxidante y oxidante evaluada en plasma sanguíneo en crías de *L. olivacea* a la emergencia. En el gráfico **A** se muestra el porcentaje de inhibición de la actividad de superóxido dismutasa; el gráfico **B** muestra la actividad de antioxidantes totales (nmol/μl), mientras que en el gráfico **C**, se muestra la actividad de peróxido de hidrógeno (μM), evaluados en el plasma sanguíneo de las crías provenientes de nidos *in-situ* y *ex-situ* bajo condiciones basales. Los resultados se presentan con promedios ± error estándar; **p<0.01, ***p<0.001.

Tabla 3. Resumen de resultados de efectos del modelo mixto lineal generalizado para los parámetros de actividad hemolítica de complemento, actividad de antioxidantes totales (TAC) actividad de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) evaluados en plasma sanguíneo de las crías de *Lepidochelys olivacea* de nidos *ex-situ*.

Variable respuesta	β (SE)	Intervalo de confianza de Wald 95%		Prueba de hipótesis	
		Mín	Máx	Wald Chi ²	Pr (> t)
Actividad hemolítica de complemento					
Intercepto	-1.6398 (0.12)				<0.001
<i>In-situ vs. ex-situ</i>	0.2845 (0.16)	-23.217	50.644	2.9757	0.0935
Actividad de TAC					
Intercepto	5.62194 (0.02)				<0.001
<i>In-situ vs. ex-situ</i>	0.09483 (0.03)	-6.5324	13.6571	8.0725	0.005
Actividad de H₂O₂					
Intercepto	5.15187 (0.08)				<0.001
<i>In-situ vs. ex-situ</i>	0.58743 (0.11)	-16.531	16.276	26.995	<0.001

β (SE): coeficiente de regresión (error estándar), Pr(>|t|): valor de *p*.

Expresión de proteínas de choque térmico y del receptor tipo Toll

Los resultados muestran que la expresión relativa de la HSP70 fue significativamente mayor en el bazo de las tortugas incubadas en nidos *ex-situ* con respecto a las tortugas provenientes de nidos *in-situ* (2.7853 ± 0.14 ; 1 ± 0.02 ; promedio \pm error estándar; respectivamente. Figura 4A). No se observaron diferencias en la expresión de HSP90 (*in-situ* = 1 ± 0.03 ; *ex-situ* = 1.1839 ± 0.06 ; promedio \pm error estándar) y TLR4 (*in-situ* = 1 ± 0.03 ; *ex-situ* = 1.4511 ± 0.03 ; promedio \pm error estándar) en bazo (Figura 4A). Por otro lado, la expresión relativa de la HSP90 fue significativamente menor en el hígado de las tortugas provenientes de la condición *ex-situ* en comparación con aquellas tortugas incubadas en nidos *in-situ* (0.2649 ± 0.009 ; 1 ± 0.12 ; promedio \pm error estándar; respectivamente. Figura 4B). El hígado no presentó diferencias en la expresión relativa de la HSP70 (*in-situ*

= 1 ± 0.13 ; *ex-situ* = 0.5999 ± 0.04 ; promedio \pm error estándar), ni en la expresión del TLR4 (*in-situ* = 1 ± 0.05 ; *ex-situ* = 1.3504 ± 0.03 ; promedio \pm error estándar; Figura 4B).

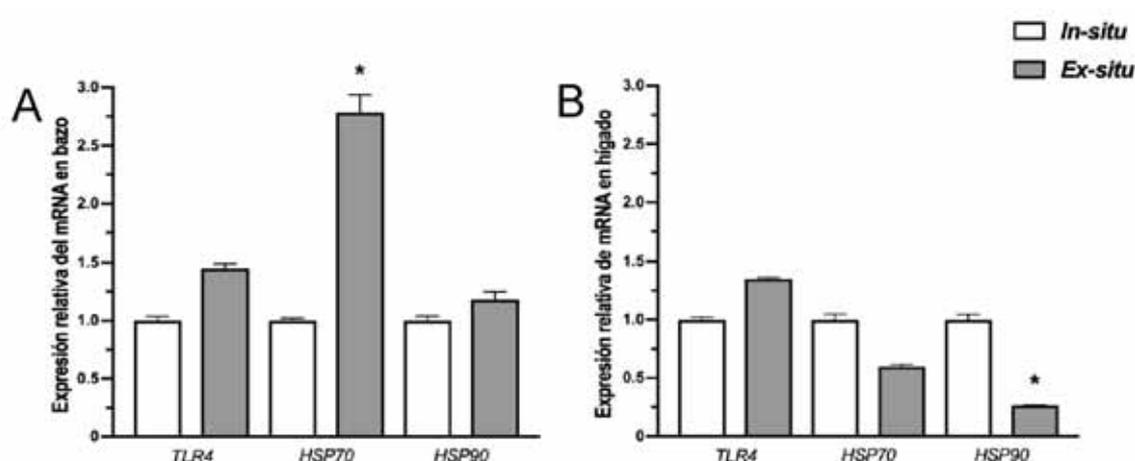


Figura 4. Expresión relativa de proteínas en bazo e hígado de crías de *L. olivacea* a la emergencia. En el gráfico **A**, se muestra la expresión relativa del mRNA en bazo; en el gráfico **B**, se muestra la expresión relativa del mRNA en hígado, comparando los promedios de las proteínas de choque térmico y del receptor tipo toll (TLR) 4, en los tejidos de crías provenientes de nidos *in-situ* y *ex-situ* bajo condiciones basales. Los resultados se presentan con promedios \pm error estándar; * $p < 0.05$.

Discusión

El presente trabajo es continuación de un reporte previo que muestra que la incubación *ex-situ* promueve el desarrollo esplénico y el incremento en los heterófilos en crías de tortuga marina a la emergencia del nido. Con el objetivo de determinar si esta configuración inmunitaria en las crías está relacionada con una mejor respuesta innata, en este trabajo se evaluó el efecto de la incubación *ex-situ* sobre la actividad de la fosfatasa alcalina, la actividad hemolítica de la vía alternativa

del complemento, la capacidad antioxidante-oxidante y la expresión de HSP70 y 90 y de TLR4 en bazo e hígado. Los resultados mostraron que la incubación *ex-situ* no alteró la actividad de la fosfatasa alcalina, ni la capacidad hemolítica del complemento. Sin embargo, se observaron cambios en la actividad antioxidante-oxidante y en la expresión de las HSP en bazo e hígado en las crías incubadas en nidos *ex-situ*. Así mismo los nidos *ex-situ* presentaron un sesgo en la determinación sexual hacia machos, mientras que en los nidos *in-situ* se observó un efecto contrario, con un 100% de hembras.

La actividad de la fosfatasa alcalina bajo condiciones basales no se modifica por la incubación ex-situ

La fosfatasa alcalina es considerada como un factor importante en la activación de los macrófagos (Azevedo y Lunardi, 2003), y sus niveles de actividad son sensibles a las temperaturas de incubación fuera de los rangos óptimos en reptiles (Tattersall *et al.*, 2012). Adicionalmente, ha sido reportado que los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina incrementan durante la inflamación, el estrés oxidante y en presencia de un reto inmunitario (Lu *et al.*, 2021). El hecho de que los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina en plasma sanguíneo no sean diferentes entre condiciones de incubación, sugiere que la respuesta basal (en ausencia de reto infeccioso) no es afectada por la condición de incubación. Este resultado es apoyado por estudios previos donde reportan que en ausencia de reto la actividad de esta enzima no mostró un efecto diferencial relacionado con la temperatura de incubación en tortugas de agua dulce (Dang *et al.*, 2015a).

En las crías de L. olivacea no se observó un efecto diferencial de la condición de incubación sobre la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento

Las proteínas del complemento dependientes de la vía alternativa están activas en estado de reposo, amplificando su actividad en presencia de infecciones (Ferat *et al.*, 2016). Estudios previos han demostrado que la actividad de esta vía es dependiente de la temperatura de incubación (Merchant *et al.*, 2015) y del sexo de los individuos (Freedberg *et al.*, 2008). Sin embargo, ha sido difícil separar los efectos de la temperatura *per se* de aquéllos del sexo (Zimmerman, 2018). En el presente trabajo las temperaturas de incubación sesgaron el sexo de las crías hacia hembras en los nidos *in-situ* y hacia machos en los nidos *ex-situ*. Este escenario permitió evaluar una respuesta diferencial del sistema del complemento asociada al sexo de las crías. El hecho de que no se hayan identificado diferencias en la respuesta basal sugiere que ambos sexos emergen con las mismas capacidades innatas para hacer frente a los retos inmunitarios reconocidos por este sistema.

Estos resultados son apoyados por reportes previos en tortugas de agua dulce (*Graptemys pseudogeographica*) incubadas en temperaturas feminizantes y masculinizantes controladas, las cuales no mostraron diferencias en la actividad hemolítica del sistema del complemento (Freedberg *et al.*, 2008). De manera interesante, el mismo estudio reporta un efecto diferencial de la temperatura de incubación (y del sexo) sobre la capacidad hemolítica en crías de tortugas mapa (*G. ouachitensis*). En este trabajo las tortugas macho presentaron una mayor capacidad hemolítica en comparación con las hembras (Freedberg *et al.*, 2008). No obstante, los resultados no son consistentes entre estudios (Paitz *et al.*, 2010).

Recientemente se ha sugerido que en reptiles adultos el sexo de los individuos puede determinar la respuesta del sistema inmunitario (Hudson *et al.*, 2021). Por otro lado, se ha sugerido que en crías la temperatura de incubación regula la inmunocompetencia independientemente del sexo (Svensson *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos aún no han sido descritos.

La incubación ex-situ reduce la actividad antioxidante-oxidante bajo condiciones basales en crías de tortuga marina a la emergencia del nido

Las crías incubadas en nidos *ex-situ* presentaron menor TAC y actividad de H₂O₂ en comparación con las crías de nidos *in-situ*. Sin embargo, la actividad de la SOD no se modificó por la condición de incubación. Los antioxidantes reducen la producción de las ROS evitando su acumulación, ya que el desbalance a favor de los agentes oxidantes puede ocasionar daño importante a nivel celular en lípidos, proteínas y/o ADN de los individuos (ej. estrés oxidante) (Sies *et al.*, 2017). El incremento de la TAC en condiciones basales de las crías *in-situ* de *L. olivacea*, puede ser un indicador de que en estos individuos la demanda de antioxidantes no enzimáticos es requerida para mitigar los efectos del H₂O₂, una estrategia que disminuye el riesgo de daños adicionales, canalizando las ROS hacia productos menos dañinos (Sies *et al.*, 2017). De tal manera que un alto contenido de antioxidantes no enzimáticos puede proteger los sitios activos críticos del daño oxidativo. Mientras que los niveles de SOD funcionan como sistemas enzimáticos que conllevan mayor desgaste energético e incremento de las ROS (Sies *et al.*, 2017), lo cual en este momento podrían resultar suficientes para equilibrar los niveles fisiológicos de las ROS (Tobler *et al.*, 2015). En lagartijas (*Ctenophorus pictus*) se

ha reportado un efecto diferencial de la temperatura y del sexo sobre la actividad antioxidante-oxidante (Tobler *et al.*, 2015). Este trabajo ha mostrado que las lagartijas macho sometidas a un reto infeccioso presentan una mayor actividad oxidante en comparación con las hembras, quienes presentan mayor actividad antioxidante. En conjunto, estos resultados sugieren una inversión diferencial del sexo en la respuesta ante las infecciones, y sugieren que las hembras disminuyen el riesgo de daño oxidante frente al reto (Tobler *et al.*, 2015). En tortugas de agua dulce (*Pelodiscus sinensis*) retadas con diferentes concentraciones de H₂O₂ se ha reportado una disminución en la actividad de las ROS y la SOD, así como un incremento en la TAC (Zhang *et al.*, 2018). La TAC en estas tortugas, fue dependiente de la concentración y el tiempo post-reto, señalando que el tejido de mayor vulnerabilidad frente a retos oxidantes fue el bazo (Zhang *et al.*, 2018). En un estudio previo se reporta que la citoarquitectura del bazo se ve disminuida en crías *in-situ* al nacimiento del nido (Robledo-Avila *et al.*, 2022), siendo el bazo el órgano principal para la respuesta humoral en reptiles.

La interacción antioxidante-oxidante observada en las crías *in-situ* a la emergencia del nido, sugiere que estas tortugas podrían ser más vulnerables a presentar estrés oxidante frente a retos ambientales y/o infecciosos posterior a la emergencia y con daño potencial en órganos diana como el bazo, como ha sido previamente propuesto (Zhang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021). Aunque en este trabajo no es posible separar los efectos de la condición de incubación, la temperatura y el sexo sobre los niveles de actividad del sistema antioxidante-oxidante, es indiscutible un efecto de la estrategia de conservación.

Las crías incubadas en condiciones ex-situ presentaron una expresión diferencial de las proteínas de choque térmico en hígado y bazo, sin cambios en la expresión del receptor de tipo Toll 4

La expresión relativa de la HSP70 en el bazo de las crías incubadas en los nidos *ex-situ* fue significativamente mayor, mientras que un efecto similar fue observado en la expresión relativa de la proteína HSP90 en el hígado de las crías provenientes de los nidos *in-situ*. La HSP70 y 90 han sido consideradas como biomarcadores para la evaluación de la termotolerancia en crías de reptiles, y su expresión diferencial se ha correlacionado con el incremento de la temperatura de incubación y con el tiempo de exposición (Gao *et al.*, 2014; Dang *et al.*, 2015b; Tedeschi *et al.*, 2015). De esta manera, se ha señalado a la HSP90 como la más susceptible a los cambios en el ambiente durante el desarrollo embrionario, independientemente del tejido en que ésta sea evaluada (Tedeschi *et al.*, 2015). En reptiles la HSP90 actúa como proteína chaperona y protege a otras proteínas como a las enzimas de la desnaturalización en temperaturas no óptimas (Tedeschi *et al.*, 2015). Así, la mayor expresión de la HSP90 en el hígado de las crías *in-situ*, permite sugerir un efecto protector ante estrés térmico. Por otro lado, la mayor expresión de las HSP70 en el bazo de las crías *ex-situ*, podría sugerir eventos relacionados con la citoarquitectura. Se ha reportado que las HSP participan como agentes inmunorreguladores, potenciando la producción de citocinas y expresión de moléculas de adhesión, enviando señales de maduración y péptidos a las células presentadoras de antígenos a través de interacciones mediadas por receptores (Pockley, 2003). De esta manera, con los antecedentes de un desarrollo adelantado del bazo en las tortugas *ex-situ* (Robledo-Avila *et al.*, 2022), sugiere que este sea un potencial

indicador de una mejor inmunocompetencia al nacimiento (Mu *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2015b).

Por su parte, la expresión relativa de TLR4 no presentó diferencias entre condiciones de incubación en ninguno de los órganos evaluados. En mamíferos el TLR4 reconoce al lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas y desencadena procesos como la fagocitosis (Nicholson, 2016). En tortugas marinas se predice la misma función (Zhou *et al.*, 2016). El hecho de que no se observe una expresión diferencial en crías de tortuga entre las dos condiciones de incubación sugiere una actividad basal similar. Será necesario evaluar en futuros experimentos su expresión diferencial en presencia de un reto infeccioso controlado y/o bajo condiciones de temperaturas fuera de los rangos óptimos del desarrollo de las tortugas.

Con estos resultados se aportan los registros basales de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento, la expresión de HSP y del TLR4, así como de estrés oxidante en crías de tortuga golfina a la emergencia del nido de la población del Santuario de la Escobilla, Oaxaca. Será necesario evaluar el efecto de la reubicación *ex-situ* en crías sometidas a un reto inmunitario sobre los parámetros aquí reportados. Adicionalmente, será necesario continuar explorando la respuesta innata humoral asociada a otras enzimas, péptidos antimicrobianos y marcadores de inflamación, entre otros, para determinar el efecto biológico potencial de la reubicación de huevos *ex-situ*.

Conclusión

El presente trabajo muestra que la reubicación de huevos en nidos *ex-situ* sesga la determinación sexual en las crías de *L. olivacea* preservando la función inmunitaria en condiciones basales.

Literatura citada

- Ávila, B.J., & Meraz, H.J. (2008). Metodología de una marcación de nidos *in situ* de *Lepidochelys olivacea* en La Escobilla, Oaxaca, México. *Ciencia y Mar*, XII 34, 25-28.
- Azevedo, A.D., & Lunardi, L.O. (2003). Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorsignih*). *Acta histochemica*, 105 1, 99-105.
- Baker, P.J., Costanzo, J.P., & Lee, R.E. (2007). Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. *Journal of Comparative Physiology B*, 177, 875-883.
- Baker, S.J., & Merchant, M. (2018). Characterization of serum complement immune activity in the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis*). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79, 1-7.
- Bates, D.M., Machler, M., Bolker, B.M., & Walker, S.C. (2014). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1-48.
- 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.
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., & Grassl, M. (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U.) Volume I, 2nd ed., 495-496, Academic Press, Inc., New York, NY

- Booth, D.T., Feeney, R., & Shibata, Y. (2013). Nest and maternal origin can influence morphology and locomotor performance of hatchling green turtles (*Chelonia mydas*) incubated in field nests. *Marine Biology*, 160, 127-137.
- Brown, G.P., & Shine, R. (2018). Immune configuration in hatchling snakes is affected by incubation moisture, and is linked to subsequent growth and survival in the field. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological and integrative physiology*, 329 4-5, 222-229.
- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A.R., Morgan, E.R., Murray, K.A., Pascoe, E.L., Sait, S.M., Wilson, A.J., & Booth, M. (2017). Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372.
- Dang, W., Zhang, W., & Du, W. (2015a). Incubation temperature affects the immune function of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Scientific Reports*, 5, 1–9.
- Dang, W., Lu, H., Gao, Y., Xu, N., Qu, T., & Liu, Y. (2015b). Molecular analysis of inducible Heat shock protein 70 of *Pelodiscus sinensis* and its effects during pathogen (*Aeromonas hydrophila*) infection. *Aquaculture*, 442, 93-99.
- Eckert K. L. (2000). Diseño de un programa de Conservación en Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. En: Eckert K. L., Bjorndal K. A., Abreu-Grobois F. A. y Donnelly M. (Editores).

- (Traducción al español). Grupo Especialista en Tortugas Marinas IUCN/CSE Publicación No.4; p. 6-8.
- Ferat O.E., Arriaga P.L., & Isibasi A.A. (2016). Sistema Complemento en Inmunología molecular, celular y traslacional. En: Pavón R.L., Jiménez M.M.C. y Garcés A.M.E. (Editores). Wolters Kluwer, Barcelona, Primera edición; p. 88-93.
- Fleming, K.A., Perrault, J.R., Stacy, N.I., Copenrath, 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*.
- Freedberg, S., Greives, T.J., Ewert, M.A., Demas, G.E., Beecher, N.A., & Nelson, C.E. (2008). Incubation Environment Affects Immune System Development in a Turtle with Environmental Sex Determination. *Journal of herpetology*.
- Gao, J., Zhang, W., Dang, W., Mou, Y., Gao, Y., Sun, B., & Du, W. (2014). Heat shock protein expression enhances heat tolerance of reptile embryos. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281.
- Gleason, F.H., Allerstorfer, M., & Lilje, O. (2020). Newly emerging diseases of marine turtles, especially sea turtle egg fusariosis (SEFT), caused by species in the *Fusarium solani* complex (FSSC). *Mycology*, 11, 184 - 194.
- Herrera-Vargas, M.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.
- Hudson, S.B., Virgin, E.E., Kepas, M.E. & French, S.S. (2021). Energy expenditure across immune challenge severities in a lizard: consequences for innate immunity, locomotor performance, and oxidative status. *The Journal of experimental biology*.
- Hoh, D.Z., Lin, Y., Liu, W., Sidique, S.N., & Tsai, I.J. (2020). Nest microbiota and pathogen abundance in sea turtle hatcheries. *Fungal Ecology*, 47, 100964.
- Hussein, M.F., Badir, N., Ridi, R.A., & Deeb, S.E. (1979). Effect of seasonal variation on immune system of the lizard, *Scincus scincus*. *Journal of Experimental Zoology*, 209, 91-96.
- IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. <https://www.iucnredlist.org> (Downloaded on 18 February 2022).
- Jensen, M.P., Allen, C.D., Eguchi, T., Bell, I.P., LaCasella, E.L., Hilton, W.A., Hof, C.A., & Dutton, P.H. (2018). Environmental Warming and Feminization of One of the Largest Sea Turtle Populations in the World. *Current Biology*, 28, 154-159.e4.
- Kanakambika, P., & Muthukkaruppan, V. (1972). Immunological Competence in the Newly Hatched Lizard, *Calotes versicolor*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 140, 21 - 23.

- Kassab, A., Shousha, S., & Fargani, A. (2009). Morphology of Blood Cells, Liver and Spleen of the Desert Tortoise (*Testudo graeca*). *The Open Anatomy Journal*, 1, 1-10.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., & Christensen, R. (2017). ImerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*, 82, 1-26.
- Les, H.L., Paitz, R.T., & Bowden, R.M. (2009). Living at Extremes: Development at the edges of viable temperature under constant and fluctuating conditions. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82, 105 - 112.
- Li, H., Zhou, Z., Wu, T., Wu, Y., & Ji, X. (2013). Do fluctuations in incubation temperature affect hatchling quality in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*? *Aquaculture*, 406, 91-96.
- Li, S., Li, J., Chen, W., Xu, Z., Xie, L., & Zhang, Y. (2021). Effects of Simulated Heat Wave on Oxidative Physiology and Immunity in Asian Yellow Pond Turtle (*Mauremys mutica*). *Frontiers in Ecology and Evolution*.
- Lu, H., Jin, J., Fan, H., & Dang, W. (2021). The magnitude of incubation temperature fluctuation affects the immunity of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) hatchlings. *Aquaculture Research*, 52(11), 5229-5238.
- Machado, Guimarães, S., Mas, Gitirana, H., Vidal, Wanderley, A., Monteiro-Neto, C., & Lobo-Hajdu, G. (2013). Evidence of regression of fibropapillomas in juvenile green turtles *Chelonia mydas* caught in Niterói, southeast Brazil. *Diseases of aquatic organisms*, 102(3), 243–247.

- Martínez-Lendeck, N., Golab, M.J., Osorio-Beristain, M., & Contreras-Garduño, J. (2018). Sexual signals reveal males' oxidative stress defences: Testing this hypothesis in an invertebrate. *Functional Ecology*, *32*, 937-947.
- Mashkour, N., Jones, K., Hipolito, T.V., Kophamel, S., Ahasan, S., Walker, G., Jakob-Hoff, R.M., Whittaker, M., Hamann, M.T., Bell, I.P., Elliman, J., Owens, L., Saladin, C., Crespo-Picazo, J.L., Gardner, B., Loganathan, A.L., Bowater, R.O., Young, E., Barnes, A.C., Robinson, D.P., Baverstock, W., Blyde, D.J., March, D., Eghbali, M., Mohammadi, M., Freggi, D., Giliam, J., Hale, M., Nicolle, N., Spiby, K., Wrobel, D., Parga, M., Mobaraki, A., Rajakaruna, R.S., Hyland, K., Read, M.A., & Ariel, E. (2020). Disease Risk Analysis in sea turtles: A baseline study to inform conservation efforts. *Plos One*. *15*, 1-32.
- Maulany, R.I., Booth, D.T., & Baxter, G.S. (2012a). The effect of incubation temperature on hatchling quality in the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia: implications for hatchery management. *Marine Biology*, *159*, 2651-2661.
- Maulany, R.I., Booth, D.T., & Baxter, G.S. (2012b). Emergence Success and Sex Ratio of Natural and Relocated Nests of Olive Ridley Turtles from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia. *Copeia*, *2012*, 738 - 747.
- Merchant-Larios, H., & Díaz-Hernández, V. (2012). Environmental Sex Determination Mechanisms in Reptiles. *Sexual Development*, *7*, 95 - 103.

- Merchant, M., Henry, D., Falconi, R., Musher, B., & Bryja, J. (2015). Characterization of Dipeptidyl Peptidase IV Enzyme Activity in Serum of the Komodo Dragon (*Varanus komodoensis*). *International Journal of Biochemistry Research and Review*, 5, 145-152.
- Merwe, J.P., Ibrahim, K., & Whittier, J.M. (2005). Effects of hatchery shading and nest depth on the development and quality of *Chelonia mydas* hatchlings: implications for hatchery management in Peninsular, Malaysia. *Australian Journal of Zoology*, 53, 205-211.
- Moleón, M.S., Merchant, M., Ortega, H.H., & Siroski, P.A. (2020). Comparison of complement system activity amongst wild and domestic animals. *Acta Herpetologica*, 15, 59-64.
- Mortimer, J. A. 2000. Reducción de las Amenazas a los Huevos y a las Crías: Los Viveros. En: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Editores). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4. p. 199-203.
- Mu, W., Wen, H., Li, J., & He, F. (2013). Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Fish & shellfish immunology*, 35 4, 1111-21.
- Muñoz, F.A., Estrada-Parra, S., Romero-Rojas, A., González-Ballesteros, E., Work, T.M., Villaseñor-Gaona, H., & Estrada-García, I. (2013). Immunological evaluation of captive green sea turtle (*Chelonia mydas*) with

- ulcerative dermatitis. *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 44 4, 837-44.
- Nicholson, L.B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60, 275 - 301.
- Paitz, R.T., Gould, A.C., Holgersson, M.C., & Bowden, R.M. (2010). Temperature, phenotype, and the evolution of temperature-dependent sex determination: how do natural incubations compare to laboratory incubations? *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 314 1, 86-93.
- Peñaflores, C. & Márquez, R. El Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas: 50 años de historia. (2016). En Gaona, O. y Barragán, A. (Coord.). Las tortugas marinas en México: Logros y perspectivas para su conservación. Soluciones Ambientales ITZENI (Ed.) Ciudad de México. 240pp.
- Perrault, J.R., Levin, M., Mott, C.R., Boverly, C.M., Bresette, M.J., Chabot, R.M., Gregory, C.R., Guertin, J.R., Hirsch, S.E., Ritchie, B.W., Weege, S.T., Welsh, R.C., Witherington, B.E., & Page-Karjian, A. (2021). Insights on Immune Function in Free-Ranging Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) with and without Fibropapillomatosis. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 11.
- Pockley, A.G. (2003). Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet*, 362, 469-476.

- Rios, F.M. & Zimmerman, L.M. (2015) Immunology of reptiles. eLS. JohnWiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Rivas, M.L., Esteban, N., & Marco, A. (2019). Potential male leatherback hatchlings exhibit higher fitness which might balance sea turtle sex ratios in the face of climate change. *Climatic Change*, 1-14.
- Robledo-Avila, L. A., Phillips-Farfán, B. V., Meléndez, M. H., Toledo, L. L., Venegas, D. T., Vargas, M. A. H., & Meléndez-Herrera, E. (2022). 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.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- Sönmez, B., Turan, C., & Özdilek, Ş.Y. (2011). The effect of relocation on the morphology of green turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), hatchlings on Samandağ beach, Turkey. *Zoology in the Middle East*, 52, 29 - 38.
- Staines, M.N., Booth, D.T., & Limpus, C.J. (2019). Microclimatic effects on the incubation success, hatchling morphology and locomotor performance of marine turtles. *Acta Oecologica*, 97, 49–56.
- Svensson, E.I., Mcadam, A.G., & Sinervo, B.R. (2009). Intralocus Sexual Conflict Over Immune Defense, Gender Load, and Sex-Specific Signaling in a Natural Lizard Population. *Evolution; international journal of organic evolution*.

- Tattersall, G. J., Sinclair, B. J., Withers, P. C., Fields, P. A., Seebacher, F., Cooper, C. E., & Maloney, S. K. (2012). Coping with thermal challenges: physiological adaptations to environmental temperatures. *Comprehensive Physiology*, 2(3), 2151-2202.
- Tedeschi, J.N., Kennington, W.J., Berry, O., Whiting, S.D., Meekan, M.G., & 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.
- Tobler, M., Ballen, C.J., Healey, M., Wilson, M.R., & Olsson, M. (2015). Oxidant trade-offs in immunity: An experimental test in a lizard. *PLoS ONE*, 10.
- Tuttle, J., & Rostal, D. (2010). Effects of nest relocation on nest temperature and embryonic development of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Chelonian Conservation and Biology*, 9(1), 1-7.
- Walter, K., & Schütt, C. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U. ed) 2nd ed., Volume II, pp 860-864, Academic Press, Inc., NY
- Wickham, H., & Bryan, J., 2019. readxl: Read Excel Files. R Package Version 1.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl> (accessed 01.02.22).
- Work, T.M., Rameyer, R.A., Balazs, G.H., Cray, C., & Chang, S.P. (2001). Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *Journal of wildlife diseases*.
- Yektaseresht, A., Gholamhosseini, A., Janparvar, A. & Salighehzadeh, R. (2016). Effect of concentration, volume and temperature of serum

- complement of common carp (*Cyprinus carpio*), on unsensitized rabbit red blood cell hemolysis. *Online Journal of Veterinary Research*, 20(8), 557-562.
- Zhang, Q., Sun, X., Wang, T., Chen, B., Huang, Y., Chen, H., & Chen, Q. (2019). The Postembryonic Development of the Immunological Barrier in the Chicken Spleens. *Journal of Immunology Research*, 2019.
- Zhou, Y., Liang, Q., Li, W., Gu, Y., Liao, X., Fang, W., & Li, X. (2016). Characterization and functional analysis of toll-like receptor 4 in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 63, 128-135.
- Zimmerman, L.M., Vogel, L.A., & Bowden, R.M. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213, 661 - 671.
- Zimmerman, L. M. (2018). Reptilia: Humoral Immunity in Reptiles. In Cooper, E. L. (Editor). *Advances in Comparative Immunology*. Springer Cham (Ed.) Switzerland. 1048 p.
- Zimmerman, L.M. (2020). The reptilian perspective on vertebrate immunity: 10 years of progress. *Journal of Experimental Biology*, 223.

X. DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo tuvo como objetivo general evaluar el efecto de la reubicación de huevos *ex-situ* sobre la respuesta innata y la condición corporal en crías de *Lepidochelys olivacea* a la emergencia del nido. Los resultados sugieren que las crías incubadas en nidos *ex-situ* presentan una mejor condición corporal y configuración inmunitaria, mientras que la función de su respuesta innata basal es preservada independiente del sesgo en la determinación sexual y favoreciendo el éxito de supervivencia de las crías. En conjunto, estos hallazgos evidencian la importancia de seguir preservando el uso de los viveros como una estrategia de protección, reubicación y manejo *ex-situ* de los huevos de tortuga marina en su hábitat de anidación, considerando las condiciones que presenta el vivero del Santuario Playa de Escobilla, Oax.

La conservación ex-situ se asocia con una mejor configuración inmunitaria y condición física en crías de lepidochelys olivacea

Los resultados mostraron que la estrategia de conservación *ex-situ* está asociada con una mejor configuración inmunitaria, evidenciada por un mayor número de agregados de tejido linfoide asociado a arterias (PALS) en bazo y un mayor índice somato-esplénico. En reptiles se ha reportado que la citoarquitectura de bazo está relacionada con una robusta respuesta humoral (Zhang *et al.*, 2019) y con la defensa contra bacterias extracelulares (Zhang *et al.*, 2016). De manera interesante, tanto la estacionalidad como la temperatura intervienen en la eficiencia de su

respuesta humoral (Muñoz y De la Fuente, 2001), incrementando el tamaño y modificando la conformación de tejido linfoide en bazo (Neely y Flajnik, 2016). Por otro lado, esta estrategia de conservación está asociada a una mejor condición física de las crías, observando mayor masa y talla corporal de las tortugas de nidos *ex-situ*. A las crías de mayor tamaño, se les ha asociado con mejores habilidades en desplazamiento, nado y tiempo de reincorporación (Fleming *et al.*, 2021), incubadas bajo temperaturas frías con periodos extendidos en la incubación (Rivas *et al.*, 2019), características que apuntan a un mejor fenotipo en las crías de tortuga (Freedberg *et al.*, 2008).

La incubación en viveros sesga la proporción sexual en crías a la emergencia del nido e incrementa su probabilidad de supervivencia

Se ha sugerido que el sexo de los individuos es un factor determinante en la eficiencia de su respuesta inmunitaria (Freedberg *et al.*, 2008). Sin embargo, para tortugas cuya diferenciación sexual está determinada genéticamente, ha sugerido que la temperatura de incubación es el factor que determinará una eficiencia en la condición y en la respuesta inmunitaria de las tortugas (Dang *et al.*, 2015a). En este trabajo se observó un efecto de la reubicación *ex-situ* en la determinación sexual, con un sesgo hacia los machos para ambos años de colecta. Sin embargo, esta variable no contribuyó a explicar las diferencias encontradas para las variables evaluadas en este proyecto. Por otra parte, se sugiere que la conservación de huevos en nidos *ex-situ* incrementa la probabilidad de supervivencia de las crías,

evidenciada por un mayor porcentaje en el éxito de eclosión y emergencia del nido. Estas características muy probablemente están asociadas a mejores condiciones de incubación, presentando bajas temperaturas y mayor humedad en los nidos (Tezak *et al.*, 2020; Reboul *et al.*, 2021).

La reubicación ex-situ favorece el mantenimiento de la respuesta inmunitaria a un menor costo que la incubación in-situ

Se ha propuesto que en organismos ectotermos factores como la temperatura (Li *et al.*, 2013) y la humedad (Brown y Shine, 2018), son determinantes en la configuración temprana del individuo para desarrollar una inmunocompetencia eficiente al nacimiento. De acuerdo con los resultados de este trabajo, la reubicación de huevos en nidos *ex-situ* favorece el mantenimiento de la respuesta innata basal en crías de *L. olivacea* a la emergencia del nido. Se ha reportado que la dinámica de los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina y la actividad hemolítica del sistema complemento, se asocian con la presencia de un reto infeccioso (Lu *et al.*, 2021), y de la temperatura de incubación independientemente del sexo de los individuos (Svensson *et al.*, 2009). Por lo que los resultados sugieren que en condiciones basales la respuesta innata (en ausencia de reto infeccioso), no es afectada por la incubación (Dang *et al.*, 2015a); sugiriendo que ambos sexos emergen con las mismas capacidades para hacer frente a los retos inmunitarios reconocidos por estos mecanismos. De manera interesante, la respuesta diferencial de la capacidad antioxidante-oxidante en plasma sanguíneo y la expresión de las

HSP70 y 90 podrían contribuir a explicar la estabilidad de los parámetros inmunitarios medidos en condiciones basales en este trabajo.

La temperatura de incubación es una variable que podría explicar los efectos de la reubicación ex-situ sobre la respuesta inmunitaria

La temperatura de incubación es uno de los factores determinantes para la diferenciación sexual de los ectotermos, y se le ha relacionado consistentemente su efectividad en la inmunocompetencia en reptiles (Freedberg *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2021). En este trabajo no fue posible evidenciar de manera directa el efecto de la temperatura de incubación entre nidos *in-situ* vs. *ex-situ*, debido a que las condiciones en playa no permitieron el desarrollo de los nidos marcados con los sensores de temperatura; sin embargo, los promedios de temperatura de la arena permitieron demostrar de manera indirecta que la temperatura de incubación observada en nidos *ex-situ*, favoreció la sobrevivencia, el desarrollo corporal y del sistema inmunitario para las crías de *L. olivacea*. En tortugas, la temperatura óptima de incubación es específica de la especie y fuera de estos rangos óptimos la inmunocompetencia decae (Les *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2021). Temperaturas letales y/o constantes pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de las tortugas (Maulany *et al.*, 2012b). Datos observados en los sensores de temperatura en nidos no exitosos *in-situ* (datos no mostrados). Esto permite señalar que la temperatura de incubación de los nidos *ex-situ* podría contribuir en gran medida a explicar los efectos de la respuesta inmunitaria aquí evaluados (Les *et al.*, 2009).

La orientación de las estrategias de conservación debe encaminarse hacia la mejora en la calidad de vida de las tortugas marinas. Es indispensable llevar a cabo una bitácora para monitorear la fluctuación de temperaturas de incubación a lo largo de la temporada de anidaciones. Así como la humedad de la arena y el sombreado del vivero, lo cual es indispensable para contrarrestar los incrementos de temperatura potencialmente letales para los embriones/crías de tortugas. De igual manera, se sugiere continuar con las recomendaciones generales realizadas en la NOM-162-SEMARNAT-2012, para el manejo y mantenimiento de los viveros para las nidadas de tortugas marinas.

XI. CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados de este trabajo indican que la conservación de huevos *ex-situ* está asociada con una mejor configuración inmunitaria, sin alterar su función inmunitaria innata basal. Esta estrategia contribuye a una mejor condición corporal de las crías, con un sesgo en la determinación sexual. Así mismo, las condiciones de incubación de huevos *ex-situ* promueve un mayor éxito de eclosión y de emergencia de crías de *L. olivacea*, favoreciendo una mayor sobrevivencia.

XII. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Será necesario evaluar en futuros experimentos el efecto de la reubicación de huevos *ex-situ* en crías con presencia de un reto infeccioso controlado y/o bajo condiciones de temperaturas fuera de los rangos óptimos del desarrollo de *L. olivacea* sobre los parámetros aquí reportados. Adicionalmente, será necesario continuar explorando la respuesta innata humoral asociada a otras enzimas, péptidos antimicrobianos y marcadores de inflamación, entre otros, para determinar el efecto biológico potencial de la reubicación de huevos *ex-situ*.

XIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Amiel, J.J., Bao, S., & Shine, R. (2017). The effects of incubation temperature on the development of the cortical forebrain in a lizard. *Anim. Cogn.* 20, 117-125. doi: 10.1007/s10071-016-0993-2
- Baker, P.J., Costanzo, J.P., & Lee, R.E. (2007). Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. *Journal of Comparative Physiology B*, 177, 875-883.
- Bárcenas-Ibarra, A., De la Cueva, H., Rojas-Lleonart, I., Abreu-Grobois, F.A., Lozano-Guzmán, R.I., Cuevas, E., & García-Gasca, A. (2015). First approximation to congenital malformation rates in embryos and hatchlings of sea turtles. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 103 3, 203-24. <https://doi.org/10.1002/bdra.23342>
- Bézy, V.S., Valverde, R.A., & Plante, C.J. (2015). Olive Ridley Sea Turtle Hatching Success as a Function of the Microbial Abundance in Nest Sand at Ostional, Costa Rica. *PLoS ONE*, 10.
- Biller-Takahashi, J.D., & Urbinati, E.C. (2014). Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86 3, 1484-506 .
- Bladow, R.A., & Milton, S.L. (2019). Embryonic mortality in green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtle nests increases with cumulative exposure to elevated temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- Bojalil-Parra, R., Massó-Rojas, F.A. & Amezcua-Guerra, L.M. 2016. Inflamación, en

- Inmunología molecular, celular y traslacional. En: Pavón R. L., Jiménez M. M. C. y Garcés A. M. E. (Editores). Wolters Kluwer, Barcelona, Primera edición; p. 106-116.
- Booth, D.T., Feeney, R., & Shibata, Y. (2013). Nest and maternal origin can influence morphology and locomotor performance of hatchling green turtles (*Chelonia mydas*) incubated in field nests. *Marine Biology*, 160, 127-137. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2070-y>
- Boulon, Jr. R. H. 2000. Reducción de las Amenazas a los Huevos y las Crías: Protección *In situ*. En: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Editores). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4; p. 192-198.
- Brown, G.P., & Shine, R. (2018). Immune configuration in hatchling snakes is affected by incubation moisture, and is linked to subsequent growth and survival in the field. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological and integrative physiology*, 329 4-5, 222-229. <https://doi.org/10.1002/jez.2154>
- Chen, S.R., & Liu, Y.X. (2016). Testis cord maintenance in mouse embryos: genes and signaling. *Biology Reproduction*. 94, 1-7. doi: 10.1095/biolreprod.115.137117
- Chen, B., Feder, M., & Kang, L. (2018). Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. *Molecular Ecology*, 27, 3040 - 3054.
- Costantini, D., & Møller, A.P. (2009). Does immune response cause oxidative stress

- in birds? A meta-analysis. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 153 3, 339-44.
- Dang, W., Zhang, W., & Du, W. (2015). Incubation temperature affects the immune function of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Scientific Reports*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep10594>
- Eckert K. L. (2000). Diseño de un programa de Conservación en Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. En: Eckert K. L., Bjorndal K. A., Abreu-Grobois F. A. y Donnelly M. (Editores). (Traducción al español). Grupo Especialista en Tortugas Marinas IUCN/CSE Publicación No.4; p. 6-8.
- El Deeb, S.O., & Saad, A.H. (1990). Ontogenic maturation of the immune system in reptiles. *Developmental and comparative immunology*, 14 2, 151-9.
- Ferat O.E., Arriaga P.L. & Isibasi A.A. (2016). Sistema Complemento en Inmunología molecular, celular y traslacional. En: Pavón R.L., Jiménez M.M.C. y Garcés A.M.E. (Editores). Wolters Kluwer, Barcelona, Primera edición; p. 88-93.
- Fleming, K.A., Perrault, J.R., Stacy, N.I., Copenrath, 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, 1–17. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa046>.
- Gammon, M.J., Fossette, S., McGrath, G.S., & Mitchell, N.J. (2020). A Systematic Review of Metabolic Heat in Sea Turtle Nests and Methods to Model Its Impact

on Hatching Success. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 283.

Gao, J., Zhang, W., Dang, W., Mou, Y., Gao, Y., Sun, B., & Du, W. (2014). Heat shock protein expression enhances heat tolerance of reptile embryos. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281.

Gatto, C.R., & Reina, R.D. (2020). The ontogeny of sea turtle hatchling swimming performance. *Biological Journal of The Linnean Society*, 131, 172-182.

Gatto, C., Matthews, B., & Reina, R. (2021). Role of incubation environment in determining thermal tolerance of sea turtle hatchlings. *Endangered Species Research*, 44, 397-408.

Gleason, F.H., Allerstorfer, M., & Lilje, O. (2020). Newly emerging diseases of marine turtles, especially sea turtle egg fusariosis (SEFT), caused by species in the *Fusarium solani* complex (FSSC). *Mycology*, 11, 184 - 194.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1710303>

Hart, C.E., Zavala-Norzagaray, A., Benítez-Luna, O., Plata-Rosas, L.J., Abreu-Grobois, F.A., & Ley-Quinónez, C.P. (2016). Effects of incubation technique on proxies for olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) neonate fitness. *Amphibia-reptilia*, 37, 417-426.

Hawkes, L. A., Broderick, A. C., Godfrey, M. H., & Godley, B. J. (2007). Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology*, 13(5), 923-932.

Herrera-Vargas, M.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>
- Hoh, D.Z., Lin, Y., Liu, W., Sidique, S.N., & Tsai, I.J. (2020). Nest microbiota and pathogen abundance in sea turtle hatcheries. *Fungal Ecology*, 47, 100964.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100964>
- IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3.
<https://www.iucnredlist.org> (Downloaded on 18 April 2022).
- Jensen, M.P., Allen, C.D., Eguchi, T., Bell, I.P., LaCasella, E.L., Hilton, W.A., Hof, C.A., & Dutton, P.H. (2018). Environmental Warming and Feminization of One of the Largest Sea Turtle Populations in the World. *Current Biology*, 28, 154-159.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.057>
- Kassab, A., Shousha, S., & Fargani, A. (2009). Morphology of Blood Cells, Liver and Spleen of the Desert Tortoise (*Testudo graeca*). *The Open Anatomy Journal*, 1, 1-10. <https://doi.org/10.2174/1877609400901010001>
- Kobayashi, S., Wada, M., Fujimoto, R., Kumazawa, Y., Arai, K., Watanabe, G., & Saito, T., 2017. The effects of nest incubation temperature on embryos and hatchlings of the loggerhead sea turtle: implications of sex difference for survival rates during early life stages. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 486, 274–281.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.10.020>.
- Lajud, N., & Torner, L. (2015). Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Front. Mol. Neurosci.* 8. doi: 10.3389/fnmol.2015.00003
- Leivesley, J.A., & Rollinson, N. (2021). Maternal provisioning and fluctuating thermal

- regimes enhance immune response in a reptile with temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Biology*, 224.
- Lesser, M.P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual review of physiology*, 68, 253-78 .
- Li, H., Zhou, Z., Wu, T., Wu, Y., & Ji, X. (2013). Do fluctuations in incubation temperature affect hatchling quality in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*? *Aquaculture*, 406, 91-96.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.011>
- Li, S., Li, J., Chen, W., Xu, Z., Xie, L., & Zhang, Y. (2021). Effects of Simulated Heat Wave on Oxidative Physiology and Immunity in Asian Yellow Pond Turtle (*Mauremys mutica*). *Frontiers in Ecology and Evolution*.
- Liang, L., Sun, B., Ma, L., & Du, W. (2014). Oxygen-dependent heat tolerance and developmental plasticity in turtle embryos. *Journal of Comparative Physiology B*, 185, 257-263.
- Lu, H., Jin, J., Fan, H., & Dang, W. (2021). The magnitude of incubation temperature fluctuation affects the immunity of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) hatchlings. *Aquaculture Research*.
- Martins, S., Silva, E., Abella, E., de Santos Loureiro, N., & Marco, A. (2020). Warmer incubation temperature influences sea turtle survival and nullifies the benefit of a female-biased sex ratio. *Climatic Change*, 163, 689 - 704.
- Mashkour, N., Jones, K., Hipolito, T.V., Kophamel, S., Ahasan, S., Walker, G., Jakob-Hoff, R.M., Whittaker, M., Hamann, M.T., Bell, I.P., Elliman, J., Owens,

- L., Saladin, C., Crespo-Picazo, J.L., Gardner, B., Loganathan, A.L., Bowater, R.O., Young, E., Barnes, A.C., Robinson, D.P., Baverstock, W., Blyde, D.J., March, D., Eghbali, M., Mohammadi, M., Freggi, D., Giliam, J., Hale, M., Nicolle, N., Spiby, K., Wrobel, D., Parga, M., Mobaraki, A., Rajakaruna, R.S., Hyland, K., Read, M.A., & Ariel, E. (2020). Disease Risk Analysis in sea turtles: A baseline study to inform conservation efforts. *Plos One*, *15*, 1-32. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230760>
- Maulany, R.I., Booth, D.T., & Baxter, G.S. (2012a). Emergence Success and Sex Ratio of Natural and Relocated Nests of Olive Ridley Turtles from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia. *Copeia*, *2012*, 738 - 747. <https://doi.org/10.1643/ch-12-088>
- Maulany, R.I., Booth, D.T., & Baxter, G.S. (2012b). The effect of incubation temperature on hatchling quality in the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia: implications for hatchery management. *Marine Biology*, *159*, 2651-2661.
- McCoy, C.J., Vogt, R.C., & Censky, E.J. (1983). Temperature-Controlled Sex Determination in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetology*, *17*, 404.
- Merchant, M., Roche, C.M., Thibodeaux, D., & Elsey, R.M. (2005). Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, *141* 3, 281-8 .
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., & Marmolejo-Valencia, A. (2010).

- Gonadal Morphogenesis and Gene Expression in Reptiles with Temperature-Dependent Sex Determination. *Sexual Development*, 4, 50 - 61.
- Merchant-Larios, H., & Díaz-Hernández, V. (2012). Environmental Sex Determination Mechanisms in Reptiles. *Sexual Development*, 7, 95 - 103.
- Monniaux, D. (2018). Factors influencing establishment of the ovarian reserve and their effects on fertility. *Animal Reproduction*. 15, 635-647. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0011
- Mortimer, J. A. (2000). Reducción de las Amenazas a los Huevos y a las Crías: Los Viveros. En: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Editores). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4. p. 199-203.
- Moss D. W. (1987). Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes. *Clinical biochemistry*, 20(4), 225–230. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(87\)80002-4](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(87)80002-4)
- Mueller, M.S., Ruiz-García, N.A., García-Gasca, A., & Abreu-Grobois, F.A. (2019). Best swimmers hatch from intermediate temperatures: Effect of incubation temperature on swimming performance of olive ridley sea turtle hatchlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- Neely, H.R., & Flajnik, M.F. (2016). Emergence and Evolution of Secondary Lymphoid Organs. *Annual review of cell and developmental biology*, 32, 693-711 .

- Nicholson, L.B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60, 275 - 301.
<https://doi.org/10.1042/EBC20160017>
- Peralta, E. y Luna, T. Tortuga Golfina. (2016). En Gaona, O. y Barragán, A. (Coord.).
Las tortugas marinas en México: Logros y perspectivas para su conservación.
Soluciones Ambientales ITZENI (Ed.) Ciudad de México. 240pp.
- Pérez-Tapia, S.M., Robledo-Avila, F.H. & Hernández-Flores, M. (2016).
Características generales de la respuesta inmunológica en Inmunología
molecular, celular y traslacional. En: Pavón R. L., Jiménez M. M. C. y Garcés
A. M. E. (Editores). Wolters Kluwer, Barcelona, Primera edición; p. 18-21.
- Pérez-Torres, A. (2016). Arquitectura del sistema inmunológico, en Inmunología
molecular, celular y traslacional. En: Pavón R. L., Jiménez M. M. C. y Garcés
A. M. E. (Editores). Wolters Kluwer, Barcelona, Primera edición; p. 43-61.
- Pfaller, J.B., Limpus, C.J., & Bjorndal, K.A. (2009). Nest-Site Selection in Individual
Loggerhead Turtles and Consequences for Doomed-Egg
Relocation. *Conservation Biology*, 23.
- Rader, B. (2017). Alkaline Phosphatase, an Unconventional Immune Protein.
Frontiers in Immunology, 8: 897. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00897>
- Riera-Romo, M., Pérez-martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in
vertebrates: an overview. *Immunology*, 148. <https://doi:10.1111/imm.12597>
- Sacchi, R., Mangiacotti, M., Scali, S., Ghitti, M., & Zuffi, M.A. (2017). Effects of Colour
Morph and Temperature on Immunity in Males and Females of the Common
Wall Lizard. *Evolutionary Biology*, 44, 496-504.
- Saito, T., Wada, M., Fujimoto, R., Kobayashi, S., & Kumazawa, Y. (2019). Effects of

- sand type on hatch, emergence, and locomotor performance in loggerhead turtle hatchlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, 29(3), 269–278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- Stacy, N.I., Pendl, H., & Wencel, P.M., 2021. Reptiles and birds. In: Sharkey, L.C., Radin, M. J., Seelig, D. (Eds.), *Veterinary Cytology*. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp. 828–868. <https://doi.org/10.1002/9781119380559.ch61>.
- Staines, M.N., Booth, D.T., & Limpus, C.J. (2019). Microclimatic effects on the incubation success, hatchling morphology and locomotor performance of marine turtles. *Acta Oecologica*, 97, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.04.008>
- 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, 356 - 368.
- Stubbs, J.L., & Mitchell, N.J. (2018). The Influence of Temperature on Embryonic Respiration, Growth, and Sex Determination in a Western Australian Population of Green Turtles (*Chelonia mydas*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 91, 1102 - 1114.

- Suhaimi, N.S., Rusli, M.U., Booth, D.T., & Joseph, J. (2020). Effect of Sand Types on the Early Swimming Performance of Green Turtle Hatchlings.
- Tang, W., Zhao, B., Chen, Y., & Du, W. (2018). Reduced egg shell permeability affects embryonic development and hatchling traits in *Lycodon rufozonatum* and *Pelodiscus sinensis*. *Integrative zoology*, 13 1, 58-69.
- Tedeschi, J.N., Kennington, W.J., Berry, O., Whiting, S.D., Meekan, M.G., & 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.
- Tezak, B., Bentley, B.P., Arena, M., Mueller, S., Snyder, T., & Sifuentes-Romero, I. (2020). Incubation environment and parental identity affect sea turtle development and hatchling phenotype. *Oecologia*, 192, 939-951.
- Tizard, I.R. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria. Elsevier, Barcelona, España Versión en español, 8va. Ed. p. 12-14; 242-243
- Tobler, M., Ballen, C., Healey, M., Wilson, M., & Olsson, M. (2015). Oxidant trade-offs in immunity: an experimental test in a lizard. *PLoS One*, 10(5), e0126155.
- Valverde, R.A., Wingard, S., Gómez, F.M., Tordoir, M.T., & Orrego, C.M. (2010). Field lethal incubation temperature of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryos at a mass nesting rookery. *Endangered Species Research*, 12, 77-86.
- Valverde, R.A., Orrego, C.M., Tordoir, M.T., Gómez, F.M., Solís, D.S., Hernández, R., Gómez, G.B., Brenes, L., Baltodano, J.P., Fonseca, L.G., & Spotila, J.R.

- (2012). Olive Ridley Mass Nesting Ecology and Egg Harvest at Ostional Beach, Costa Rica.
- Wallace, B.P., Sotherland, P.R., Spotila, J.R., Reina, R.D., Franks, B.F., & Paladino, F.V. (2004). Biotic and Abiotic Factors Affect the Nest Environment of Embryonic Leatherback Turtles, *Dermochelys coriacea*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77, 423 - 432.
- Ware, M., & Fuentes, M.M. (2018). Potential for Relocation to Alter the Incubation Environment and Productivity of Sea Turtle Nests in the Northern Gulf of Mexico. *Chelonian Conservation and Biology: Celebrating 25 Years as the World's Turtle and Tortoise Journal*, 17, 252 - 262.
- Wibbels, T., Rostal, D.C., & Byles, R.A. (1998). High Pivotal Temperature in the Sex Determination of the Olive Ridley Sea Turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Playa Nancite, Costa Rica. *Copeia*, 1998, 1086-1088.
- Wood, A.L., Booth, D.T., & Limpus, C.J. (2014). Sun exposure, nest temperature and loggerhead turtle hatchlings: Implications for beach shading management strategies at sea turtle rookeries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 451, 105-114.
- Work, T.M., Balazs, G.H., Rameyer, R.A., Chang, S.P., & Berestecky, J.M. (2000). Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 74 3-4, 179-94.
- Yatim, K.M., y Lakkis, F.G. (2015). A brief journey through the immune system.

- Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 10 7, 1274-81.
- Zhang, A., Xu, J., Lai, H., Huang, W., Fang, N., & Chen, R. (2017). Age-related changes and distribution of T cell markers (CD3 and CD4) and toll-like receptors (TLR2, TLR3, TLR4 and TLR7) in the duck lymphoid organs. *Immunobiology*, 222 7, 857-864
- Zhang, Q., Sun, X., Wang, T., Chen, B., Huang, Y., Chen, H., & Chen, Q. (2019a). The Postembryonic Development of the Immunological Barrier in the Chicken Spleens. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6279360>
- Zhang, W., Jia, H., Niu, C., Chen, X., & Storey, K.B. (2019b). Effect of exogenous hydrogen peroxide on ROS balance and antioxidant response in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Aquaculture*.
- Zimmerman, L.M., Vogel, L.A., & Bowden, R.M. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213, 661 - 671. <https://doi.org/10.1242/jeb.038315>
- Zimmerman, L.M. (2020). The reptilian perspective on vertebrate immunity: 10 years of progress. *Journal of Experimental Biology*, 223.

XIV. CAPÍTULO III.

Nidos de tortuga marina ¿Por qué controlar su temperatura?

Artículo de Divulgación Científica

Publicado en la revista: Saber Más de la UMSNH

ARTÍCULO

Nidos de tortuga marina ¿Por qué controlar su temperatura?

Liliana Areli Robledo Ávila y Esperanza Meléndez Herrera



Liliana Areli Robledo Ávila. Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas en el Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

lilysrb@gmail.com

Esperanza Meléndez Herrera. Profesora-Investigadora del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

emelendez@umich.mx

Las tortugas marinas son reptiles longevos de naturaleza altamente migratoria y en riesgo potencial de extinción. Entre sus principales amenazas se encuentra la pesca incidental, la contaminación, la depredación y el cambio climático. A nivel mundial se han creado diversas estrategias para conservar a las siete especies de tortugas marinas que habitan en México. Estas estrategias han logrado incrementar las poblaciones de algunas especies como la golfina (*Lepidochelys olivacea*) en la costa del pacífico mexicano, con escaso efecto sobre otras especies como la laúd (*Dermochelys*

coriacea). Una de las estrategias mayormente empleadas es la protección de nidadas completas en viveros con el objetivo de evitar la depredación.

La estrategia más exitosa: los viveros de nidadas de tortuga

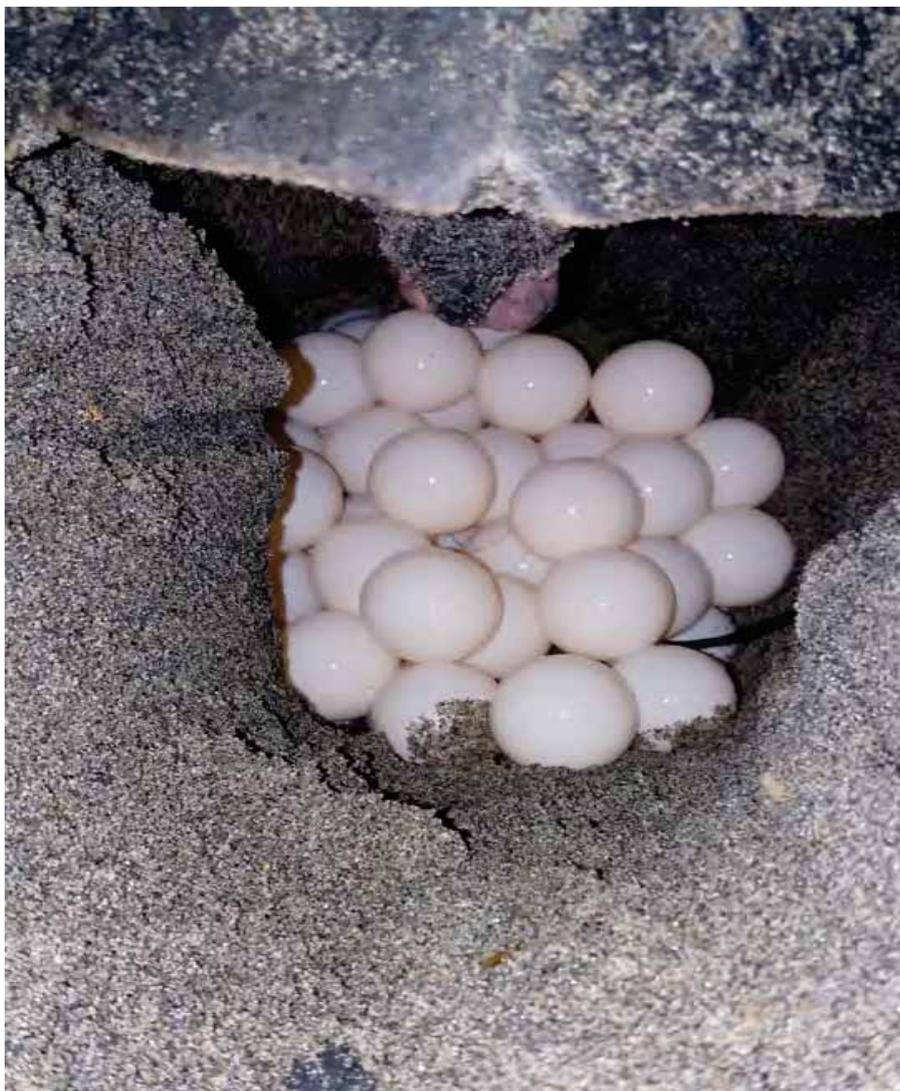
La reubicación de huevos de tortuga en viveros protegidos depende en buena medida del personal capacitado de estos lugares, quienes identifican a las hembras anidantes y recogen la nidada completa con ayuda de bolsas o cubetas para transportar los huevos hasta el vivero en donde serán colocados en nidos construidos previamente. Los embriones de tortuga permanecen en los nidos reubicados hasta la emergencia del nido (>45 días). Al finalizar su incubación se toma el registro de las características del nido (especie, número de crías emergidas, fecha de inicio y fin de incubación) y las crías son transportadas a la playa para su liberación a mar abierto. Esta estrategia es muy eficiente por-

que involucra a las comunidades locales y atrae al turismo hacia las playas de anidación. No obstante, puede producir alteraciones en la respuesta fisiológica de los organismos, las cuales apenas se están comenzando a entender.

Es claro que reubicar al nido completo, una vez que la hembra anidante ha terminado de depositar sus huevos en la playa, es lo mejor que se puede hacer para evitar el saqueo y favorecer el desarrollo de los embriones. Sin embargo, la reubicación de los huevos en etapas tempranas de la ontogenia puede alterar mecanismos fisiológicos que permiten el desarrollo óptimo de los embriones al interior del nido. Existe evidencia que sugiere que la hembra anidante escoge los mejores sitios para dejar sus huevos, seleccionando el tipo de grano, la temperatura y la humedad de la arena, entre otras variables. Si bien los nidos reubicados intentan emular lo mejor posible las condiciones naturales siguiendo normas establecidas, existen factores



Condiciones del nido y la determinación sexual de las tortugas. Fotografía: Robledo Ávila L.A.



El cambio climático y sus efectos en el desarrollo de las tortugas.
Fotografía: Robledo Ávila L.A.

importantes para el desarrollo de los huevos que no se controlan y que pueden tener consecuencias negativas para la aptitud de las crías a corto y largo plazo.

La importancia de la temperatura en los nidos

Recientemente se ha descrito que la temperatura, la humedad, el tamaño de las partículas de arena, el intercambio gaseoso y la presencia de parásitos en los sitios de anidación son factores importantes para el desarrollo óptimo de las tortugas marinas al interior del nido; particularmente, se ha reportado un efecto predominante de la temperatura de incubación para varias especies de tortugas marinas como la golfina, la tortuga boba (*Caretta caretta*) y la tortuga verde (*Chelonia mydas*).

La temperatura del nido tiene un efecto directo sobre la determinación sexual de las tortugas; en la mayoría de las especies las temperaturas más templadas promueven la diferenciación de machos (~28 °C) y temperaturas más cálidas promueven el desarrollo de hembras (~32 °C), mientras temperaturas intermedias permiten la diferenciación de ambos sexos (~31.7 °C). Además del sexo, la temperatura parece tener un efecto sobre la diferenciación y la

formación temprana de células, órganos y tejidos, y un efecto tardío sobre el crecimiento del embrión. El primer proceso constituye la organogénesis, y es un periodo crítico que define el establecimiento del plan corporal del embrión en desarrollo. El segundo proceso está caracterizado por el incremento en la división celular y en el tamaño del embrión.

Múltiples estudios sugieren que temperaturas de incubación extremas (por encima de los 34-35 °C o por debajo de los 24-25 °C) causan efectos adversos sobre el desarrollo y viabilidad de los embriones de tortugas marinas. Particularmente, se ha descrito que **temperaturas muy elevadas aceleran el tiempo de eclosión** y emergencia del nido produciendo crías más pequeñas con mayor cantidad de reservas energéticas (vitelo). Por otra parte, **temperaturas de incubación por debajo de los 28 °C alargan el tiempo de incubación** y producen crías más grandes, pero con menos reservas energéticas. Aún no está clara la relevancia funcio-



Fotografía de Robledo Ávila L.A.

nal de estos cambios para la supervivencia de las crías, debido a que algunos estudios sugieren que estas deben tener suficientes reservas energéticas para llegar a mar abierto. Otros estudios muestran que las crías más grandes tienen mejor desempeño locomotor y alcanzan más rápido el mar evitando depredadores en la playa.

No únicamente las temperaturas extremas mantenidas a lo largo del periodo de incubación pueden tener un efecto sobre los embriones en desarrollo. Algunos estudios sugieren que incluso **pequeños cambios en la temperatura tienen efectos negativos** sobre la talla corporal y la organogénesis en tortugas a la emergencia. Estos estudios muestran que la reubicación de los huevos en viveros y la elevación de menos de un grado centígrado en la temperatura promedio en los nidos reubicados, reduce la longitud de las crías y la proliferación de células en el ovario. Una vez más, la relevancia funcional de estos hallazgos aún no se conoce. Sin embargo, estudios en mamíferos sugieren que estas alteraciones podrían tener consecuencias a largo plazo sobre su reproducción.

Otros estudios realizados en su mayoría en tortugas terrestres y dulceacuícolas, sugieren que temperaturas de incubación masculinizantes o feminizantes pueden tener efectos sobre la respuesta inmunitaria innata en las crías en etapas perinatales. Algunos de estos estudios muestran que las temperaturas feminizantes disminuyen la respuesta inflamatoria, la actividad de algunas de las proteínas capaces de combatir microorganismos patógenos y la expresión de proteínas relevantes para la diferenciación de células inmunitarias, lo que favorece la muerte de los organismos ante infecciones.

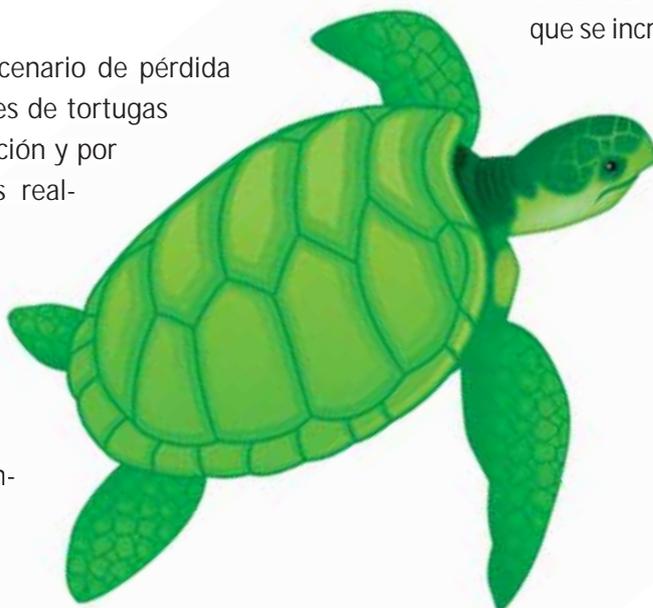
Recientemente un estudio ha reportado que temperaturas de incubación por encima de los 33 °C en nidos *in situ*, afectan la aptitud de las crías a la emergencia al decrementar su talla corporal, su capacidad locomotriz, su tasa cardíaca, e incrementan poblaciones de células inmunitarias relacionadas con inflamación en ausencia de infección, entre otros rasgos negativos para la supervivencia. De manera interesante, otros estudios han logrado demostrar que incluso elevaciones transitorias en la temperatura de incubación someten al organismo

a estrés térmico, incrementando la expresión de proteínas de choque térmico muy probablemente para tolerar estos cambios en el ambiente.

Hasta el momento se conoce con detalle el mecanismo mediante el cual la temperatura determina el sexo de las tortugas durante el segundo tercio de la incubación. Sin embargo, **poco se sabe acerca de los mecanismos que alteran el fenotipo de las crías** a la emergencia y durante los periodos tempranos de la vida.

El control de la temperatura en los viveros es primordial

En el actual escenario de pérdida masiva de poblaciones de tortugas marinas por depredación y por cambio climático, es realmente necesario proteger a las nidadas completas reubicándolas en viveros protegidos. Sin embargo, para poder implemen-



tar técnicas de mitigación de la temperatura, es indispensable **identificar muy bien su efecto sobre el desarrollo temprano de las crías de tortuga**, con el objetivo de optimizarlo y evitar las consecuencias negativas a nivel poblacional a corto y largo plazo. Así, resulta indispensable que los encargados de los viveros y los miembros de las comunidades que se encargan de reubicar los huevos conozcan los efectos de regar la arena de los viveros, proteger los nidos con malla sombra o incluso sembrar los nidos a una distancia óptima que evite que se incremente el calor metabólico al interior del nido.



Fleming, K. A., Perrault, J. R., Stacy, N. I., Coppenrath, C. M. y 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), 1-17. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa046>

Herrera-Vargas, M. A., Meléndez-Herrera, E., Gutiérrez-Ospina, G., Bucio-Piña, F. E., Báez-Saldaña, A., Siliceo-Cantero, H. H. y 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(Artículo 400). <https://doi:10.3389/fmars.2017.00400>

Herrera-Vargas, M. A., Meléndez-Herrera, E., Gutiérrez-Ospina, G. y Fuentes-Farías, A. (2014). Efectos de la exposición prenatal al estrés asociado a la incubación artificial, sobre el desarrollo de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*). *Biológicas*, 16(1) 53-58. <https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=204>

Mueller, M. S., Ruiz-García, N. A., García-Gasca, A. y Abreu-Grobois, F. A. (2019). Best Swimmers Hatch from Intermediate Temperatures: Effect of Incubation Temperature on Swimming Performance of Olive Ridley Sea Turtle Hatchlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 519. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151186>