

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

INFLUENCIA MATERNA Y SU INTERACCIÓN CON VARIABLES CLIMÁTICAS EN LA DETERMINACIÓN SEXUAL DE *CAIMAN LATIROSTRIS*

Lic. Florencia Elizabeth Valli

Director de Tesis: Dra. Marcela Aida González
Co-director de Tesis: Dra. Melina Soledad Simoncini

Centro de Investigación Científica y de Transferencia Tecnológica a la
Producción (CICYTTP-CONICET)

-2025-

Agradecimientos

A las instituciones públicas, la **Universidad Nacional del Litoral (UNL)** que me permitió cursar tanto mi formación de grado como de posgrado en dicha institución y al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)** por permitirme, a través de la beca otorgada, llevar a cabo este trabajo. Al **Centro de Investigación Científica y de Transferencia Tecnológica a la Producción (CICYTTP - CONICET - Prov. E.R. – UADER)**, por brindarme el espacio para desarrollar la tesis doctoral. También al **Grupo de Especialistas en Cocodrilos** por la beca otorgada, y a la **Provincia de Santa Fe** por el apoyo financiero brindado a través del programa “Becas de Posgrado en Áreas Estratégicas”, los cuales contribuyeron significativamente al desarrollo y la realización de esta tesis.

A mis directores por su acompañamiento a lo largo de todo este camino. A **Marcela González** por acompañarme tanto en mi formación de grado como de posgrado y por su calidez y amabilidad siempre. A **Melina Simoncini**, por su acompañamiento tanto en lo académico como en lo personal, por estar siempre presente, por su disposición, por las oportunidades brindadas y por su apoyo incondicional. A **Carlos Piña** también agradecerle por su acompañamiento, por confiar en mí, y guiarme durante todo el camino.

A los compañeros que integran y que pasaron por el **Laboratorio de Ecología Animal**, con quienes tuve el placer de compartir trabajos y momentos de los cuales siempre voy a estar agradecida. A **Evangelina Viotto, Micaela Mazaratti, Pamela Leiva y Sofía Pierini**, además de compañeras de laboratorio y de trabajo, amigas, apoyo incondicional, compañeras de cuarto y de aventuras inolvidables. A **Antonio Frutos, Gisela Chiale, Gerardo Vega, Gonzalo Pighin, Jazmín Bauso, Leonardo Scarpa, Rayén Estrada Pacheco y Victoria Torres** compañeros que aportaron y ayudaron durante el desarrollo de la tesis, agradecerles tanto por las enseñanzas laborales como personales y por los lindos momentos compartidos.

A todos los miembros del **Proyecto Yacaré** que me abrieron las puertas y con su buena onda fueron parte de esta experiencia. Agradecerles a todos por su ayuda, por su paciencia y sus enseñanzas a lo largo de este camino.

A las personas que integran el **CICYTTP – CONICET**, tanto a las autoridades, como a los compañeros becarios, investigadores y personal del instituto, que tuve el agrado de conocer y compartir momentos.

A **mis amigos**, que fueron fundamentales. Tanto a aquellos que me han acompañado toda la vida como a quienes tuve el placer de conocer durante mi formación de grado. Gracias por estar

siempre a mi lado, por brindarme apoyo cuando lo necesité y por escucharme siempre, tanto en los momentos felices como en aquellos que se tornaron un poco más difíciles. Por ser pilares y por darme el aliento para seguir siempre...

*A **Silvano**, gracias por tu acompañamiento en este camino, por hacerlo más liviano y más lindo con tu presencia. Por darme calma, apoyo y contención cuando más lo necesitaba. Por siempre entender y acompañar durante este proceso.*

*A **mi familia**. A mis padres **Laura y Omar**, porque siempre estuvieron atrás de todo esto y fueron parte, porque no hubiera sido posible sin ustedes. Agradezco tenerlos y poder compartirlo con ustedes. A mi hermano **Javier** y a **Clarisa** que además me dieron la alegría de convertirme en la tía de **Fausto**. A **mis gatitos Canoa y Susi** por ser mis compañeros en las mañanas y en las largas noches de trabajo.*

Aportes Científico-Tecnológicos

Valli, F. E., Vera Candioti, L., Leiva, P. M., Mazaratti, M. R., Pierini, S. E., Piña, C. I., González, M. A. & Simoncini, M. S. (2025). Fat and Oil From *Eunectes notaeus*: Characterization and Prospects for Nutritional Supplementation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 127(5), e70020.

Mazaratti, M. R., **Valli, F. E.**, Pierini, S. E., Gonzalez, M. A., Piña, C. I., Cuffia, F., ... & Leiva, P. M. (2024). Physicochemical and sensory characterisation of *Salvator merianae* meat as a sustainable alternative. *International Journal of Food Science and Technology*, 59(7), 4500-4509.

Leiva, P. M., Simoncini, M. S., **Valli, F. E.**, Pina, C. I., Gonzalez, M. A., & Cuffia, F. (2023). Non-conventional meat as a sustainable alternative for consumption: Case of *Eunectes notaeus*, physicochemical, microbiological and sensory characterization. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 33, 100760.

Valli, F. E., Simoncini, M. S., González, M. A., & Piña, C. I. (2023). How do maternal androgens and estrogens affect sex determination in reptiles with temperature-dependent sex?. *Development, Growth & Differentiation*, 65(9), 565-576.

Mazaratti, M. R., **Valli, F. E.**, Pierini, S. E., Simoncini, M. S., Piña, C. I., González, M. A., & Leiva, P. M. (2023). Reptile bushmeat, an alternative for the supply of high biological value proteins?. *Sustainability*, 15(9), 7448.

Valli, F. E., Leiva, P. M., Lavandera, J., Contini, M. C., Gerstner, C., Piña, C. I., ... & González, M. A. (2023). Caiman's fat enriched with n-3 fatty acids: potential food supplement. *Tropical Animal Health and Production*, 55(3), 194.

Leiva, P. M., **Valli, F. E.**, Piña, C. I., González, M. A., & Simoncini, M. S. (2022). Chemical characterization and potential use of reptile fat from sustainable programs. *Ethnobiology and Conservation*, 11.

Vera-Candioti, L., Leiva, P. M., **Valli, F. E.**, Bernal, C. A., Piña, C. I., Simoncini, M. S., & González, M. A. (2021). Optimization of oil extraction from caiman fat. Characterization for use as food supplement. *Food Chemistry*, 357, 129755.

Índice general

Abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Abstract.....	13
Introducción general.....	16
Determinación sexual por temperatura.....	16
<i>Genética en la DST</i>	18
<i>Epigenética de la DST</i>	20
<i>Hormonas</i>	21
Hormonas esteroides.....	22
<i>Rol de las hormonas esteroideas maternas en la determinación sexual de reptiles</i>	23
<i>Rol de las hormonas esteroides en la determinación sexual de cocodrilianos</i>	25
<i>Metabolismo de hormonas esteroideas en la yema de huevo</i>	26
Importancia de los lípidos en la reproducción y desarrollo embrionario de reptiles.....	27
Ácidos grasos: características y funciones biológicas.....	28
Descripción de la especie <i>Caiman latirostris</i>	30
<i>Biología reproductiva</i>	31
<i>Determinación sexual por temperatura en Caiman latirostris</i>	32
<i>Desarrollo embrionario</i>	33
Impacto del cambio climático y variables climáticas sobre la biodiversidad: importancia de su estudio en reptiles.....	35
Objetivos.....	38
Objetivo general.....	38
Objetivos específicos.....	38
Hipótesis.....	38
Capítulo 1: Inversión materna de ácidos grasos y hormonas esteroides y su relación con la determinación sexual por temperatura de <i>Caiman latirostris</i>.....	39
1.1. Introducción.....	39
1.2. Objetivos.....	40
1.3. Materiales y métodos.....	40
1.3.1. <i>Recolección de nidos y obtención de muestras</i>	41
1.3.2. <i>Sexado de los animales</i>	43
1.3.3. <i>Procesamiento de muestras en laboratorio</i>	44
1.3.3.1. <i>Perfil de ácidos grasos de la yema de huevo</i>	44
1.3.3.2. <i>Determinación de hormonas esteroides en yema del huevo</i>	45

1.3.4. Relación entre ácidos grasos y hormonas esteroides en la yema de huevo	46
1.3.5. Análisis de datos	46
1.4. Resultados.....	47
1.4.1. Inversión materna de ácidos grasos en yema de huevo	48
1.4.2. Inversión materna de hormonas esteroides en yema de huevo	50
1.4.3. Relación entre ácidos grasos, hormonas esteroides y el porcentaje de hembras de los nidos	51
1.4.4. Relación entre las hormonas esteroides y el porcentaje de hembras de nidos	53
1.4.5. Asociación entre niveles hormonales, proporción de hembras y tamaño de postura de los nidos con la morfometría del huevo	55
1.5. Discusión	55
1.5.1. Inversión materna de ácidos grasos en naturaleza y semicautiverio.....	55
1.5.2. Inversión materna de hormonas esteroides en yema de huevo	56
1.5.3. Relación entre la inversión de ácidos grasos y hormonas esteroides con la proporción sexual de los nidos	57
Capítulo 2: Impacto de las condiciones climáticas en la inversión de hormonas esteroides y ácidos grasos en la yema de huevo en <i>Caiman latirostris</i> y su efecto sobre la determinación sexual.....	60
2.1. Introducción.....	60
2.2. Objetivos.....	61
2.3. Materiales y métodos	62
2.3.1. Obtención de nidos.....	62
2.3.2. Caracterización climática de las temporadas de estudio	63
2.3.3. Perfil de ácidos grasos en la yema de huevo de nidos de las diferentes temporadas	64
2.3.4. Concentración de hormonas esteroides en la yema de huevo de nidos de las diferentes temporadas.....	64
2.3.5. Determinación del sexo de los animales en las diferentes temporadas	64
2.3.6. Variables climáticas.....	64
2.3.7. Análisis de datos	65
2.4. Resultados.....	66
2.4.1. Caracterización climática de las temporadas de estudio	66
2.4.3. Concentración de hormonas esteroides en la yema de huevo de nidos de las diferentes temporadas.....	72
2.4.4. Porcentaje de hembras de las diferentes temporadas analizadas.....	72
2.4.5. Relación entre variables climáticas, ácidos grasos y porcentaje de hembras de los nidos	73

2.4.6. Relación entre variables climáticas, hormonas esteroides y porcentaje de hembras.....	74
2.5. Discusión	76
2.5.1. Caracterización climática de las temporadas de estudio	76
2.5.2. Ácidos grasos y hormonas esteroides de la yema de huevo en las diferentes temporadas	76
2.5.3. Relación entre las variables climáticas, ácidos grasos depositados en la yema de huevo y porcentaje de hembras de los nidos	77
2.5.4. Relación de las variables climáticas con las hormonas esteroides depositadas en la yema de huevo y porcentaje de hembras producidas en los nidos	79
2.5.5. Efecto del ambiente sobre la proporción de hembras producidas en los nidos.....	80
Capítulo 3: Cambios en los niveles de hormonas esteroides y ácidos grasos durante el desarrollo embrionario de <i>Caiman latirostris</i>	83
3.1. Introducción.....	83
3.2. Objetivos.....	85
3.3. Materiales y métodos.....	85
3.3.1. Toma de muestras.....	85
3.3.2. Perfil de ácidos grasos durante los diferentes estadios de desarrollo.....	86
3.3.3. Determinación de hormonas esteroides durante los diferentes estadios de desarrollo.....	86
3.3.4. Expresión de genes relacionados con la determinación sexual.....	87
3.3.5. Análisis estadístico.....	89
3.4. Resultados.....	90
3.4.1. Variación de ácidos grasos durante el PTS	90
3.4.2. Variación de hormonas esteroides durante el PTS	91
3.4.3. Expresión de genes relacionados con la determinación sexual durante el PTS.....	92
3.5. Discusión	94
3.5.1. Variación de ácidos grasos durante el PTS	94
3.5.2. Variación de hormonas esteroides durante el PTS	96
3.5.3 Expresión de genes relacionados con la determinación sexual durante el PTS	98
Capítulo 4: Discusión general y conclusiones	102
4.1. Discusión general	102
4.2. Conclusiones finales	107
Bibliografía	110
Anexos	142
Anexo I	142
Anexo II.....	147
Anexo III.....	155

Abreviaturas

AA: ácido araquidónico

ACP: análisis de componentes principales

ADNc: ADN copia

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

AGS: ácidos grasos saturados

AIC: Akaike

Amh: gen que codifica para la hormona anti-mülleriana

Cyp19a1: gen que codifica para la enzima aromatasa

DAS: Determinación ambiental del sexo

DGS: Determinación genética del sexo

DHA: ácido docosahexaenoico

DHT: 5 α -dihidrotestosterona

Dmrt1: gen que codifica para Double sex and mab-3 related transcription factor 1

DST: Determinación sexual por temperatura

E₂: 17 β -estradiol

ENOS: El Niño/Oscilación del Sur

EPA: ácido eicosapentaenoico

ESR1: receptor de estrógenos α

ESR2: receptor de estrógenos β

Esr1: gen que codifica para el receptor de estrógeno α

FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos

GLM: modelos lineales generalizado

GLMMs: modelos lineales generalizados mixtos

GAM: complejo gónada-adrenal-mesonefros

Foxl2: gen que codifica para Forkhead box protein L2

H3K27me₃: histona trimetilada H3 lisina 27

L8: gen que codifica para la proteína ribosomal L8

LCR: longitud cráneo-rabadilla

LDC: largo dorso-craneal

LHC: longitud hocico-cloaca

MAG: modelo aditivo generalizado

MCA: membrana corioalantoidea

NMDS: análisis no métrico multidimensional

PDSI: Índice de severidad de sequía de palmer
PERMANOVA: Análisis de Varianza Multivariante Permutacional
PPAR: Receptores activados por proliferadores peroxisomales
PTS: período termosensible
PUFAs: polyunsaturated fatty acids
RA: receptores de andrógenos
RE: receptores de estrógenos
RG: receptores de glucocorticoides
RMSE: error cuadrático medio de predicción
RP: receptores de progesterona
rspo1: gen que codifica para R-spondin1
srd5a1: gen que codifica para la enzima para la enzima 5- α reductasa
sox9: gen que codifica para SRY-Box Transcription Factor 9
T: Testosterona
UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

Resumen

El yacaré overo (*Caiman latirostris*) es una especie que posee determinación sexual por temperatura (DST). En *C. latirostris* la DST ha sido ampliamente estudiada, presentando un período termosensible (PTS) que ocurre en el segundo tercio del período de incubación que se localiza entre los estadios 19 y 24, conociéndose que a temperaturas constantes entre 29 y 31 °C se producen 100% hembras y entre 33 y 34 °C 100% machos. A temperaturas de incubación constante de 32°C se verificó que se producen crías de ambos sexos, y los nidos respondieron de diferente manera, produciendo desde 18 a 100 % de hembras, lo que indicaría que la determinación sexual podría estar influenciada por una contribución materno-hormonal. Por otro lado, los cambios lipídicos más importantes en la yema de huevo se registraron durante las etapas del PTS por lo que podrían estar involucrados en la biosíntesis de hormonas esteroides. A su vez, cabe mencionar que las variables climáticas (precipitaciones y temperatura) influyen en la cantidad de nidos de caimanes encontrados en la naturaleza durante la temporada reproductiva, y están fuertemente relacionadas con la optimización de la inversión materna en la progenie, el éxito de eclosión y la calidad de las crías. Por lo que, tanto las condiciones ambientales de la temporada como la inversión de hormonas esteroides maternas y de ácidos grasos, podrían actuar sinérgicamente en la determinación del sexo de la cría de huevos incubados en la naturaleza. El estudio de la influencia de las condiciones climáticas sobre la inversión materna permitiría comprender mejor las respuestas particulares de cada nido al proceso de incubación y determinación sexual, lo cual resulta de importancia para especies con DST, como *C. latirostris* ya que, dentro de un margen térmico estrecho de incubación de huevos, los límites superior e inferior pueden producir 100% de machos o 100% de hembras. Este margen estrecho puede abarcar una diferencia de solo 2°C o 3°C, es por esto que el incremento de la temperatura debido al calentamiento global podría perjudicar la supervivencia de estas especies, ya sea por la temperatura durante el proceso de incubación, sino también por el condicionamiento de la inversión materna.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ambiente y la inversión materno-hormonal y energética sobre la determinación sexual de *Caiman latirostris*. La importancia del desarrollo del presente proyecto se basa en incrementar los conocimientos de la biología de la especie, en particular sobre la determinación sexual y sus mecanismos. De este modo, al momento de tomar decisiones de conservación, se dispondrá de un mayor abanico de estrategias, lo que incrementará las oportunidades de supervivencia de la especie.

Se recolectaron huevos de *Caiman latirostris* en cuatro localidades de la provincia de Santa Fe (Cacique Ariacaiquín, Los Amores, Santa Fe y Santurce) durante cuatro temporadas consecutivas (2020, 2021, 2022 y 2023). En la yema de los huevos, se caracterizó la inversión materna de hormonas esteroides, específicamente 17β-estradiol (E₂) y testosterona (T), y de ácidos grasos a lo largo de las cuatro temporadas, y también durante el desarrollo embrionario, específicamente al inicio

(estadio 19), mitad (estadio 21) y final (estadio 24) del PTS, incubando los nidos a una temperatura constante de 32 °C. En primer lugar, se analizó la variación en la inversión materna de hormonas esteroides tanto entre nidos (internidada) como dentro de cada nido (intranidada). Posteriormente, se compararon los nidos según su origen (naturales o semicautiverio), evaluando las diferencias en el perfil de ácidos grasos y hormonas esteroides. También se comparó la inversión entre temporadas y localidades de colecta, considerando las condiciones micro y macroclimáticas. Además, se relacionó la inversión materna de hormonas esteroides, ácidos grasos y variables climáticas previas a la oviposición (temperaturas medias y precipitaciones acumuladas) con el porcentaje de hembras obtenido en cada nido. Por otro lado, durante el PTS, se evaluaron los cambios en el porcentaje de ácidos grasos y hormonas esteroides, y se recolectaron muestras del complejo gónada-adrenal-mesonefros (GAM). Finalmente, a partir del GAM, se analizó la expresión génica de enzimas esteroidogénicas (aromatasa, *cyp19a1*, y 5 α -reductasa, *srd5a1*), así como de genes asociados con la determinación sexual (*amh*, *sox9* y *foxl2*).

La concentración de E₂ en la yema de los huevos varió tanto entre nidos como dentro de cada nido. En contraste, T no mostró diferencias ni entre nidos ni dentro de ellos. El análisis del perfil de ácidos grasos reveló diferencias en la composición entre nidos provenientes de semicautiverio y de naturaleza. De los 20 ácidos grasos evaluados, 14 presentaron diferencias, destacándose el ácido linoleico (18:2 n-6), cuyo porcentaje fue mayor en los nidos de semicautiverio. Para E₂ y T no hubo diferencias entre nidos naturales y de semicautiverio. Debido a ello, para el estudio de la relación entre los ácidos grasos y las variables climáticas se decidió excluir los nidos de semicautiverio, y utilizar exclusivamente los nidos de naturaleza. No se encontró una relación entre la inversión materna de ácidos grasos y hormonas esteroides en la yema de huevo. Sin embargo, la concentración de E₂ se asoció de manera no lineal con el porcentaje de hembras obtenido en los nidos, mientras que la T no mostró relación con el sexo de las crías. Asimismo, los nidos con menores proporciones de ácido palmítico (16:0) y ácido palmitoleico (16:1 n-9) presentaron porcentajes más bajos de hembras. Las condiciones climáticas previas a la oviposición tuvieron influencia en la inversión de ácidos grasos, de T y del porcentaje de hembras pero no así de E₂. Mayores temperaturas en los meses de septiembre y octubre se asociaron con un mayor porcentaje de hembras y de 16:0 en la yema de huevo. Además, cuando en estos meses las temperaturas medias y las precipitaciones acumuladas fueron más altas los nidos mostraron porcentajes mayores de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) como el ácido araquidónico (20:4 n-6), ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3), y ácido docosahexaenoico (22:6 n-3). A lo largo del período de estudio, la proporción de hembras en los nidos disminuyó de 76,67 % en la primera temporada a 31 % en la última, lo que evidencia un aumento en la producción de crías macho en un contexto de predominio e intensificación del fenómeno climático “La Niña”.

Durante el desarrollo embrionario, el perfil de ácidos grasos no presentó variaciones, aunque algunos ácidos grasos individuales mostraron cambios a lo largo del PTS. La concentración de E₂

disminuyó entre el inicio y la mitad del PTS, mientras que T, por el contrario, mostró un aumento en la mitad del PTS en comparación con la inversión materna inicial. Los genes asociados con la determinación sexual se expresaron en niveles diferentes a 32 °C (temperatura que produce ambos sexos) en comparación con las temperaturas productoras de hembras (31 °C) y machos (33 °C). La expresión de la aromatasa no se relacionó con el porcentaje de hembras obtenido en los nidos y no se pudo detectar la expresión de la enzima *srd5a1*.

A partir de estos resultados, se puede concluir que ciertos componentes maternos, como el E₂ depositado en la yema de huevo, pueden influir en la determinación sexual del yacaré overo. Sin embargo, es probable que otros factores maternos actúen en sinergia con el E₂ para determinar el desarrollo de la gónada hacia hembras o machos. En contraste, la inversión materna de T parecería cumplir un rol principalmente fisiológico, sin relación directa con la determinación sexual. Las variables climáticas previas a la oviposición influyeron tanto en la composición de ácidos grasos como en los niveles de T, así como en el porcentaje de hembras en los nidos. En particular, los ácidos grasos 16:0 y 16:1 n-7 se asociaron con una menor proporción de hembras, lo que sugiere que podrían estar implicados en la determinación sexual o representar una consecuencia de la inversión materna en temporadas con condiciones climáticas extremas, como las registradas durante el fenómeno “La Niña”. Dicho fenómeno coincidió con una reducción del porcentaje de hembras en los nidos, incluso cuando estos fueron incubados a temperatura constante, lo que respalda la hipótesis de que componentes maternos modulados por el ambiente ejercen influencia sobre el sexo de la descendencia.

Por otra parte, la ausencia de relación entre la expresión de *cyp19a1* y el porcentaje de hembras sugiere que la expresión de este gen es una consecuencia más que un determinante primario del sexo, mientras que la *srd5a1* no estaría involucrada en las etapas del desarrollo embrionario del yacaré overo analizadas en este estudio.

Abstract

The broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) is a species with temperature-dependent sex determination (TSD). In *C. latirostris*, TSD has been extensively studied, revealing a thermosensitive period (TSP) that occurs during the second third of the incubation period, between stages 19 and 24. It is known that constant incubation temperatures between 29 and 31 °C produce 100% females, whereas temperatures between 33 and 34 °C produce 100% males. At a constant incubation temperature of 32 °C, both sexes are produced, and individual nests respond differently, producing between 18 and 100% females, suggesting that sex determination may be influenced by maternal hormonal contributions. In addition, the most significant lipid changes in the egg yolk occur during the TSP, suggesting that they may be involved in steroid hormone biosynthesis. It is also worth noting that climatic variables (precipitation and temperature) influence the number of caiman nests found in the wild during the reproductive season, and are strongly related to the optimization of maternal investment in offspring, hatching success, and hatchling quality. Therefore, both seasonal environmental conditions and maternal investment of steroid hormones and fatty acids may act synergistically in determining the sex of eggs incubated in wild. Studying the influence of climatic conditions on maternal investment will allow a better understanding of the particular responses of each nest to incubation and sex determination, which is of importance for species with TSD, such as *C. latirostris*. Within a narrow thermal window for egg incubation, the upper and lower limits can result in 100% males or 100% females. This window may span only 2–3 °C; thus, temperature increases driven by global warming could threaten the survival of these species, not only by altering incubation temperatures but also by affecting maternal investment.

The aim of this study was to evaluate the effect of the environment and maternal hormonal and energetic investment on sex determination in *Caiman latirostris*. The importance of developing this project lies in increasing knowledge of the species' biology, particularly regarding sex determination and its mechanisms. In this way, when making conservation decisions, a wider range of strategies will be available, which will enhance the species' chances of survival.

Eggs of *Caiman latirostris* were collected in four localities of Santa Fe Province (Cacique Ariacaiquín, Los Amores, Santa Fe, and Santurce) during four consecutive seasons (2020, 2021, 2022, and 2023). In the egg yolk, maternal investment of steroid hormones, specifically 17 β -estradiol (E₂) and testosterone (T), and of fatty acids was characterized throughout the four seasons, and also during embryonic development, specifically at the beginning (stage 19), middle (stage 21), and end (stage 24) of the TSP, incubating the nests at a constant temperature of 32 °C. First, the variation in maternal investment of steroid hormones was analyzed both among nests (inter-nest) and within each nest (intra-nest). Subsequently, nests were compared according to their origin (wild or semi-captive), evaluating differences in the profile of fatty acids and steroid hormones. Investment was also

compared among seasons and collection localities, considering micro- and macroclimatic conditions. In addition, maternal investment of steroid hormones, fatty acids, and climatic variables prior to oviposition (mean temperatures and accumulated precipitation) was related to the percentage of females obtained in each nest. On the other hand, during the TSP, changes in the percentage of fatty acids and steroid hormones were evaluated, and samples of the gonad-adrenal-mesonephros complex (GAM) were collected. Finally, from the GAM, gene expression of steroidogenic enzymes (aromatase, *cyp19a1*, and 5 α -reductase, *srd5a1*), as well as genes associated with sex determination (*amh*, *sox9*, and *foxl2*), was analyzed.

The concentration of E₂ in the egg yolk varied both among nests and within each nest. In contrast, T did not differ among or within nests. The fatty acid profile analysis revealed differences in fatty acid composition between semi-captive and wild nests. Of the 20 fatty acids evaluated, 14 showed significant differences, with linoleic acid (18:2 n-6) being higher in semi-captive nests. In contrast, no differences in E₂ or T were observed between wild and semi-captive nests. Therefore, for the study of the relationship between fatty acids and climatic variables, the nests from semicaptivity were excluded, and only the natural nests were used.

. No relationship was found between maternal fatty acid and steroid hormone investment in egg yolk. However, E₂ concentration was nonlinearly associated with the percentage of females produced in nests, whereas T showed no relationship with offspring sex. Furthermore, nests with lower proportions of palmitic acid (16:0) and palmitoleic acid (16:1 n-9) produced fewer females. Pre-oviposition climatic conditions influenced fatty acid composition, T levels, and the percentage of females, but not E₂ levels. Higher mean temperatures in September and October were associated with an increase in both the percentage of females and the proportion of 16:0 in egg yolk. Moreover, when mean temperatures and accumulated precipitation were higher during these months, nests had higher proportions of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as arachidonic acid (20:4 n-6), eicosapentaenoic acid (20:5 n-3), and docosahexaenoic acid (22:6 n-3). Over the course of the study, the proportion of females decreased from 76.67% in the first season to 31% in the last, indicating an increase in male production under conditions of predominance and intensification of the “La Niña” climate phenomenon.

During embryonic development, no changes in the fatty acid profile were observed, although some individual fatty acids varied during the TSP. E₂ concentration decreased between the onset and midpoint of the TSP, whereas T increased at mid-TSP compared with initial maternal levels. Genes associated with sex determination were expressed at different levels at 32 °C (the temperature that produces both sexes) compared to the female-producing (31 °C) and male-producing (33 °C) temperatures. Aromatase expression was not related to the percentage of females in nests, and we were unable to detect the expression of *srd5a1*.

Based on these results, it can be concluded that certain maternal components, such as E₂ deposited in the egg yolk, may influence sex determination in the broad-snouted caiman. However, other maternal factors likely act synergistically with E₂ to direct gonadal development toward either females or males. In contrast, maternal T investment appears to play a primarily physiological role, with no direct involvement in sex determination. Pre-oviposition climatic variables influenced both fatty acid composition and T levels, as well as the proportion of females in nests. In particular, fatty acids 16:0 and 16:1 n-7 were associated with a lower proportion of females, suggesting that they may be involved in sex determination or may reflect maternal investment under extreme climatic conditions, such as those occurring during “La Niña”. This phenomenon coincided with reduced female production in nests, even when incubated at constant temperature, supporting the hypothesis that environmentally modulated maternal components influence offspring sex.

On the other hand, the absence of a relationship between *cyp19a1* expression and the percentage of females suggests that the expression of this gene is a consequence rather than a primary determinant of sex, while *srd5a1* would not be involved in the embryonic developmental stages of the broad-snouted caiman analyzed in this study.

Introducción general

Determinación sexual por temperatura

La determinación sexual en reptiles puede ser genética (determinación genética del sexo, DGS) o ambiental (determinación ambiental del sexo, DAS), aunque en algunas especies pueden existir ambos sistemas de determinación del sexo (Valenzuela, 2008; Matsubara, 2018). La determinación del sexo por temperatura (DST) es un tipo de DAS en la que la temperatura de incubación es responsable de la determinación del sexo gonadal del embrión durante un período llamado período termosensible (PTS). A diferencia de DGS, las especies con DST no presentan cromosomas sexuales (Matsumoto & Crews, 2012; Matsubara, 2018). Dentro de los reptiles, algunos órdenes como Chelonia, Crocodylia, Squamata y Rhynchocephalia presentan DST (Martínez-Juarez & Moreno-Mendoza, 2019).

En algunas especies con DST, la temperatura de incubación es la que define el sexo del embrión, ciertas temperaturas producen exclusivamente machos y otras producen exclusivamente hembras (Ferguson & Joanen, 1982; 1983). Por otro lado, existen temperaturas sesgadas a la producción de un sexo, produciendo más del 50% pero menos del 100%, y otras temperaturas que producen el 50% de cada sexo, denominadas temperaturas pivotaes (Simoncini et al., 2019; Roush & Rhen, 2018). Algunas especies producen hembras a bajas temperaturas de incubación y machos a altas temperaturas de incubación, mientras que en otras especies ocurre lo contrario y se han establecido patrones de DST en base a esto. Las especies que producen machos a bajas temperaturas y hembras a altas temperaturas tienen un patrón de DST denominado MF, las que producen hembras a bajas temperaturas y machos a altas temperaturas presentan el patrón FM, y ambos patrones tienen una sola temperatura pivotal (Ewert & Nelson, 1991). Existe otro patrón llamado FMF que produce hembras a bajas y altas temperaturas y machos a temperaturas intermedias, y puede tener dos temperaturas pivotaes (Lang & Andrews, 1994). El patrón FMFM fue descrito por Inamdar-Doddamani et al. (2012), donde los machos y las hembras se producen a temperaturas de incubación altas y bajas y puede tener tres temperaturas pivotaes (Fig. 1).

Estos patrones varían entre las especies de reptiles, por ejemplo en cocodrilidos como *Alligator mississippiensis*, *Caiman latirostris* y *Crocodylus porosus*, y algunas tortugas, como *Podocnemis expansa*, presentan el patrón FMF (Lang & Andrews, 1994; Bonach et al., 2011; Parachú-Marcó et al., 2017), mientras que otras especies de tortugas, como *Chrysemys picta*, y algunas especies lagartijas presentan el patrón MF (Bull & Vogt, 1979; Ewert & Nelson, 1991; Ewert et al., 1994; González et al., 2019). El patrón FM es menos común y está presente en tuataras (*Sphenodon punctatus*) y en algunas especies de lagartijas (Cree et al., 1995; Mitchell et al., 2006). Finalmente, el patrón FMFM se observó por primera vez en la lagartija *Calotes versicolor*. Este patrón podría haber evolucionado como una adaptación de la especie para mantener la proporción sexual debido al

calentamiento global (Inamdar-Doddamani et al., 2012). El patrón de DST de cada especie es el mismo en toda su distribución, pero la sensibilidad a la temperatura puede cambiar ya que, dependiendo de la distribución geográfica de las poblaciones, existen diferencias en las temperaturas pivotaes y/o el rango de transición de temperatura (temperaturas que producen ambos sexos; Roush & Rhen, 2018).

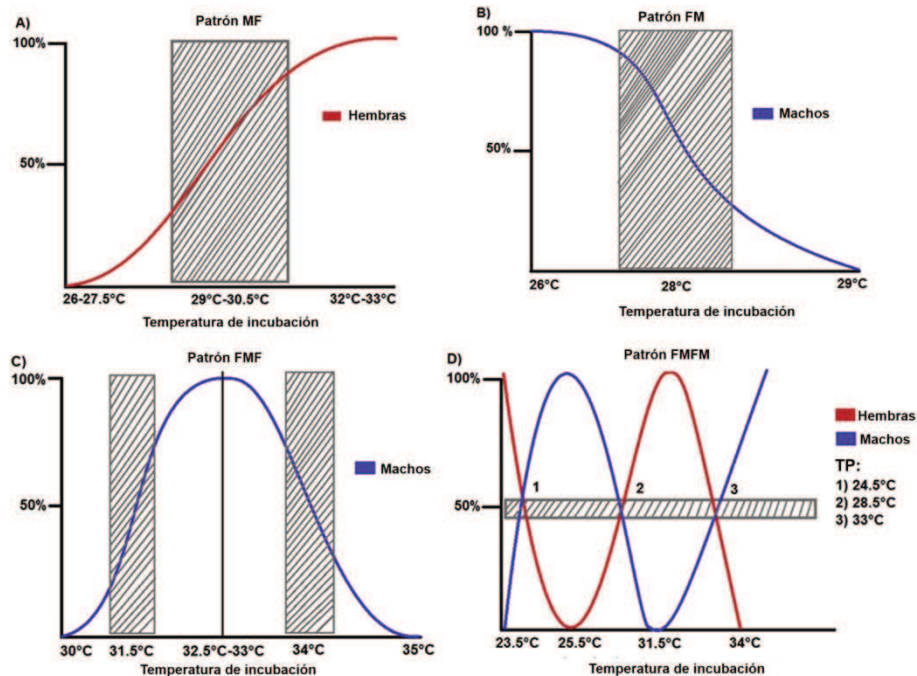


Figura 1: Representación esquemática de los diferentes patrones de determinación sexual por temperatura en especies de reptiles. A) Patrón MF, B) Patrón FM, C) Patrón FMF, D) Patrón FMFM. TP = temperaturas pivotaes, representada con el área rayada. Figura modificada de Martínez-Juárez & Moreno-Mendoza, 2019.

Debido a que la DST es una característica frecuente en los reptiles, ha sido ampliamente estudiada con el objetivo de esclarecer sus mecanismos. Los estudios relacionados con los mecanismos de determinación del sexo están más avanzados en las especies con DST que en las que tienen DGS. Dos de las especies más estudiadas son el caimán americano (*Alligator mississippiensis*) y la tortuga *Trachemys scripta* (Matsubara, 2018). Se han realizado numerosos estudios de laboratorio donde los huevos se incubaron a temperaturas constantes; estos proyectos de investigación son esenciales para comprender y describir aspectos de la DST entre especies (Bowden & Paitz, 2018). En la actualidad, los mecanismos que permiten transformar la temperatura de incubación en una señal biológica no están del todo claros (Martínez-Juárez & Moreno-Mendoza, 2019; Bowden & Paitz, 2021). Se han desarrollado estudios epigenéticos, genéticos y hormonales para comprender estos mecanismos. Se presume que la temperatura de incubación inicia una cascada de señales moleculares que producen un sexo, alterando la expresión genética, la señalización de hormonas esteroides, los

receptores hormonales y las enzimas esteroidogénicas (Mizoguchi & Valenzuela, 2016; Roush & Rhen, 2018; Martínez-Juárez & Moreno-Mendoza, 2019; Weber & Capel, 2021).

Genética en la DST

Existen algunas lagunas en el conocimiento sobre los genes involucrados en la DST. Los genes relacionados con la DST que han sido estudiados en numerosos trabajos son *dmrt1* (Double sex and mab-3related transcription factor 1) y *sox9* (SRY-Box Transcription Factor 9), ambos relacionados con la masculinización del embrión. *Dmrt1* ha sido ampliamente estudiado en la tortuga *Trachemys scripta*. Este gen codifica un factor de transcripción con un patrón de expresión sexualmente dimórfico dependiente de la temperatura, previo a la diferenciación gonadal. Este gen parece ser necesario y suficiente para iniciar el desarrollo masculino en *T. scripta* y participar en la regulación de la DST ya que se ubica en un nivel alto de la red de expresión génica, superior a *sox9* y *amh* durante el inicio de la diferenciación sexual (Ge et al., 2017). *Sox9* codifica para un factor de transcripción involucrado en la diferenciación de las células de Sertoli, estas células son esenciales para la diferenciación de los testículos. La función de este gen fue estudiada en diferentes modelos de reptiles: cocodrilos como *Alligator mississippiensis* (Western et al., 1999a), tortugas como *Lepidochelys olivacea* (Moreno-Mendoza et al., 1999) y *T. scripta* (Wibbels et al., 1998), lagartijas como *Eublepharis macularius* (Valleley et al., 2001) y en otros vertebrados (Kent et al., 1996; Vining et al., 2021). Otro gen relacionado con la masculinización es *amh*, que codifica para la hormona anti-mülleriana (secretada por las células de Sertoli); y junto con *sox9* son esenciales para diferenciar la gónada bipotencial en testículos (Achermann et al., 1999). En *A. mississippiensis* la expresión *amh* precede a la expresión *sox9* (Western et al., 1999b), a diferencia de las tortugas *L. olivacea* y *T. scripta* donde *sox9* precede a la expresión de *amh* (Shoemaker et al., 2007a; Shoemaker et al., 2007b; Sifuentes-Romero et al., 2013).

Por otro lado, las redes genéticas involucradas en la feminización incluyen los genes *rspo1* (Respondin1) y *foxl2* (Forkhead box protein L2). El gen *rspo1* codifica una proteína que tiene un papel importante en el desarrollo ovárico de los mamíferos (Shoemaker & Crews, 2009). Smith et al. (2008) estudiaron la expresión de este gen en las gónadas de *Trachemys scripta* y determinaron que es mayor en embriones incubados a temperaturas de producción de hembras durante el inicio del PTS. *Rspo1* es sensible a la temperatura y su expresión se reduce en embriones cuando su temperatura de incubación cambia de temperaturas productoras de hembras a temperaturas productoras de machos (Smith et al., 2008). *Foxl2* codifica para un factor de transcripción que está involucrado en la diferenciación de ovarios y es un represor conservado de la red genética para la determinación sexual masculina en mamíferos (Uhlenhaut et al., 2009; She & Yang, 2014). En la actualidad, los mecanismos de regulación de estos genes no se comprenden completamente. Sin embargo, las condiciones ambientales como la temperatura, influyen en la expresión de los genes implicados en el desarrollo

gonadal alterando el estado epigenético de las regiones reguladoras (Matsumoto & Crews, 2012; Weber & Capel, 2021)(Tabla 1).

Tabla 1: Genes involucrados en la determinación sexual dependiente de la temperatura (TSD) en reptiles.

Genes involucrados en las redes reguladoras asociadas a la diferenciación ovárica.	Nombre completo	Función
<i>Cyp19a1</i>	Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1	Gen que codifica para la enzima aromatasa, enzima encargada de convertir andrógenos en estrógenos ¹ .
<i>Foxl2</i>	Forkhead box protein L2	Factor de transcripción que posee un papel en el desarrollo ovárico, se expresa en la corteza ovárica en desarrollo ^{2,3} .
<i>Rspo1</i>	R-Spondin 1	Codifica para una proteína reguladora de la vía de señalización Wnt/ β -catenina ⁴ .
Genes involucrados en las redes reguladoras asociadas a la diferenciación testicular	Nombre completo	Función
<i>Amh</i>	Hormona anti-mülleriana	Hormona secretada por las células de Sertoli embrionarias, encargada de inhibir los conductos de Müller ⁵ .
<i>Drmt1</i>	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1	Factor de transcripción que se encuentra en la cresta genital y en el complejo GAM, promoviendo el desarrollo de testículos ^{6,7} .
<i>Sox9</i>	SRY-Box Transcription Factor 9	Factor de transcripción involucrado en la diferenciación de las células de Sertoli ^{8,9} .

GAM: Complejo gónada-adrenal-mesonefros. ¹ Bao et al. (2017), ²Rhen et al. (2007), ³Shoemaker et al. (2007a),

⁴ Smith et al. (2008), ⁵Shoemaker et al. (2007b), ⁶Kettlewell et al. (2000), ⁷Murdock & Wibbels (2003),

⁸Western et al. (1999a), ⁹Moreno-Mendoza et al. (2001).

TRPV4 es un canal catiónico termosensible que se activa con calor moderado en mamíferos (Gees et al., 2011; Vay et al., 2012). Yatsu et al. (2015) investigaron el papel del canal iónico TRPV4 (AmTRPV4) como sensor de temperatura en la determinación sexual de *Alligator mississippiensis* utilizando análisis electrofisiológicos y manipulación farmacológica para esclarecer el vínculo de este canal con genes relacionados con la diferenciación gonadal hacia testículos u ovarios. Los resultados de este trabajo mostraron que la actividad del canal puede influir en la vía de diferenciación sexual

masculina a nivel molecular, pero no afecta la red génica que conduce a la diferenciación ovárica. Además, en *Crocodylus moreletii*, detectaron expresión de *TRPV4* en el citoplasma de las células de Sertoli, lo que convierte a este canal en un posible regulador de *sox9* (Martínez-Juárez et al., 2018). Los estudios realizados en el caimán chino (*A. sinensis*) no han encontrado una expresión sexualmente dimórfica de *TRPV4*, pero sí una expresión diferencial en otros canales TRP como TRPV2, TRPC6 y TRPM6 durante el PTS (Lin et al., 2018). La actividad de estos canales por sí sola no explica el inicio de la determinación del sexo, pero la familia de genes TRP podría desempeñar un papel importante actuando en conjunto con otros elementos aún no identificados.

Epigenética de la DST

Existe evidencia de que los factores epigenéticos son los responsables de la regulación de la expresión génica y que, junto con la temperatura, generan señales que desencadenan la diferenciación celular (Singh et al., 2020). La metilación del ADN y la modificación de histonas se estudiaron en especies de reptiles con DST, ya que median diversos efectos ambientales sobre el fenotipo (Matsumoto et al., 2013; Matsumoto et al., 2016). En peces y tortugas estudiaron el papel de la metilación de citosinas en el ADN, concretamente en la región promotora del gen de la aromatasa (*cyp19a1*), la enzima responsable de la síntesis de estrógenos. Estas metilaciones del ADN están asociadas con el silenciamiento génico (Matsumoto et al., 2013) y, en este caso, podrían resultar en una menor expresión de la enzima. Se han identificado diferencias en la metilación del ADN en las gónadas de embriones incubados a temperaturas productoras de machos y hembras. Las temperaturas que producen hembras favorecen la desmetilación y, en consecuencia, una mayor expresión de la enzima aromatasa. A temperaturas productoras de machos ocurre lo contrario (Navarro-Martín et al., 2011; Matsumoto et al., 2013; Fan et al., 2017). Además, evaluaron los genes involucrados en la metilación del ADN, la modificación de histonas y algunos ARN no codificantes y demostraron que su regulación era diferente a las temperaturas de producción masculinas y femeninas (Radhakrishnan et al., 2018).

El gen *kdm6b* codifica para una histona desmetilasa (Burchfield et al., 2015) y su transcripción responde a la temperatura y juega un papel importante en DST del sexo masculino (Ge et al., 2018). Esta enzima cumple la función de desmetilar la histona H3K27me3 (histona trimetilada H3 lisina 27) en el promotor de *drmt1* aumentando su expresión y estimulando el desarrollo de los testículos en *Trachemys scripta* (Ge et al., 2018). Estudios realizados por Ge et al. (2018) a temperaturas constantes demostraron que durante el PTS la expresión de *kdm6b* aumenta y que su represión conduce al desarrollo de gónadas femeninas, aumentando la expresión de los genes *cyp19a1* y *foxl2*. En *T. scripta*, ocurre un splicing alternativo de *kdm6b* que es termosensible (Ge et al., 2018; Marroquín-Flores et al., 2021). A temperaturas productoras de machos (en *T. scripta*, menores que las temperaturas productoras de hembras), se observa un aumento en las transcripciones de *kdm6b* que

retiene intrones. Sin embargo, cuando los huevos se incuban a temperaturas productoras de hembras (más cálidas que las productoras de machos) la abundancia de transcritos de *kdm6b* permanece igual, pero disminuye la cantidad de transcritos que contienen intrones (Marroquín-Flores et al., 2021). La transcripción del intrón sería responsable de aumentar la tasa de transcripción de *kdm6b*, regulando positivamente a *drmt1* y generando la producción de machos en *T. scripta*.

En *Alligator mississippiensis*, Yatsu et al. (2016) demostraron que al igual que a temperaturas productoras de hembras también se produce la retención de intrones del transcritos de *kdm6b*. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en *Trachemys scripta*, las temperaturas que producen hembras son mas bajas que las productoras de machos en cocodrilianos. A pesar de esto, la expresión de *drmt1* aumenta a las temperaturas de producción de machos durante el PTS en cocodrilianos (Smith et al., 1999; Anand et al., 2008). Por lo tanto, *kdm6b* exhibe retención de intrones sensible a la temperatura, pero la retención de intrones en *kdm6b* conduce a diferentes resultados fenotípicos en tortugas y cocodrilos. Actualmente, su función en cocodrilianos no está clara, por lo que se necesitan más estudios para comprender su papel en la determinación sexual de estas especies.

Hormonas

Aunque la temperatura de incubación juega un papel fundamental en la DST, varios estudios han demostrado que las hormonas esteroides también pueden influir en la determinación del sexo. A temperaturas a las que se producen crías de ambos sexos, los nidos de distintas hembras responden de diferente forma tanto en la naturaleza como en condiciones de laboratorio (Lang & Andrews, 1994; Simoncini et al., 2014; Parachú-Marcó et al., 2017). Esto podría deberse a una contribución hormonal materna, es decir, hormonas esteroides depositadas por la hembra en la yema del huevo. Según Roush & Rhen (2018), las hipótesis sobre los efectos de los esteroides maternos en la proporción de sexos de un nido se basan en 1) evidencia de que la concentración de esteroides en la yema de huevo varía entre nidos de diferentes hembras (Conley et al., 1997; Janzen et al., 1998), 2) la variación dentro del nido en hormonas esteroides es insignificante en comparación con la variación entre nidos (Conley et al., 1997; Janzen et al., 1998; Bowden et al., 2000), y 3) la aplicación exógena de hormonas en los huevos influye en la determinación del sexo (Bull et al., 1988; Wibbels et al., 1991; Rhen & Lang, 1994; Tabla 2).

Tabla 2: Variación de hormonas esteroides intra e inter nidada en tortugas, cocodrilianos y lagartijas, y el efecto en la determinación sexual de la exposición del huevo a hormonas esteroides exógenas.

	Hormonas intranidada	Hormonas internidada	Aplicación de hormonas esteroideas exógenas
Tortugas			
Andrógenos	No varía ¹	Varían ¹	DHT = masculiniza ⁴ T = feminiza ^{5,6} T + inhibidor de aromatasa = masculiniza ⁷
Estrógenos	No varía ²	Varían ^{2,3}	E ₂ = feminiza ^{7,8}
Cocodrilianos			
Andrógenos	No varía ⁹	No varía ⁹	MT = masculiniza ¹⁰
Estrógenos	Varía ⁹	Varía ⁹	E2 = feminiza ^{11,12}
Lagartos			
Andrógenos	No varía ¹³	Solo T varía ¹³	DHT = masculiniza ¹⁴
Estrógenos	No varía ¹³	No varía ¹³	E2 = feminiza ¹⁵

¹ *Chelydra serpentina*, *Trachemys Scripta* (Janzen et al., 1998); ² *C. serpentina*, *T. scripta* (Elf et al., 2002); ³ *Caretta caretta* (Lockley et al., 2020); ⁴ *T. scripta* (Wibbels & Crews, 1992); ⁵ *T. scripta* (Crews & Bergeron, 1994); ⁶ *T. scripta* (Pieau, 1996); ⁷ *C. serpentina* (Rhen & Lang, 1994); ⁸ *Chrysemys picta* (Warner et al., 2017); ⁹ *Alligator mississippiensis* (Conley et al., 1997); ¹⁰ *Crocodylus acutus*, *A. mississippiensis* (Murray et al., 2016); ¹¹ *A. mississippiensis* (Crain et al., 1997); ¹² *Caiman latirostris* (Stoker et al., 2003); ¹³ *Eublepharis macularius* (Rhen et al., 2006); ¹⁴ *Bassiana duperreyi* (Radder et al., 2009); ¹⁵ *E. macularius* (Janes et al., 2007). E₂, 17β-estradiol; DHT, dihidrotestosterona; MT, 17α- metiltestosterona; T, testosterona.

Hormonas esteroides

Las hormonas esteroides son moléculas orgánicas de naturaleza lipídica, ya que derivan del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Se sintetizan en la glándula suprarrenal y en las gónadas a partir del colesterol que es convertido en pregnonelona por la enzima citocromo P450, siendo éste el punto regulador para su síntesis (Beato, 2000; Cole et al., 2019). Según al receptor al que se unen se pueden clasificar en, andrógenos (19 carbonos), estrógenos (18 carbonos), corticoides (21 carbonos) y progestágenos (21 carbonos) (Henley et al., 2005). Al ser moléculas lipofílicas, las hormonas esteroides atraviesan la membrana celular y se unen a receptores intracelulares. Estos receptores, pertenecientes a la familia de receptores nucleares tipo I, se encuentran inactivos principalmente en el citoplasma (como los receptores de glucocorticoides y andrógenos) o en el núcleo (como los receptores de estrógenos) hasta que se produce la unión con la hormona (Linja et al., 2004; Levin & Hammes, 2016). Cuando la hormona esteroide difunde por la membrana celular y se une al receptor,

se produce la dimerización del mismo y en el núcleo se une a sitios específicos del ADN reprimiendo o activando la transcripción de determinados genes (Robinson-Rechavi et al., 2003; Levin & Hammes, 2016). Los andrógenos son responsables del desarrollo de las características sexuales masculinas, y los estrógenos están encargados del desarrollo de las características sexuales femeninas y también participan en la regulación de las funciones reproductivas masculinas en algunos animales (Cooke et al., 2017; Verderame & Scudiero, 2018). Las acciones de estas hormonas están mediadas por receptores nucleares específicos ubicados en las células blanco: los receptores de andrógenos (RA) y los receptores de estrógenos (RE). Estos receptores actúan como reguladores de la señalización hormonal; una vez que la hormona se une a su receptor, se desencadenan cambios en la expresión génica. (Jenster et al., 1997; Katsu et al., 2008; Ogino et al., 2018).

Las hormonas esteroides desempeñan diversas funciones fisiológicas en los vertebrados. Si bien su papel principal está relacionado con la regulación de las funciones sexuales, también intervienen en procesos clave como el crecimiento y la diferenciación celular, la homeostasis y la modulación de ciertos rasgos de comportamiento (Meylan et al., 2002; Petelle et al., 2017; Ogino et al., 2018; Potticary & Duckworth, 2018).

Rol de las hormonas esteroideas maternas en la determinación sexual de reptiles

La yema de huevo en los amniotas ovíparos es una fuente de hormonas esteroides de origen materno. Existe evidencia de la presencia de hormonas esteroides sexuales en la yema de huevo de los reptiles que poseen DGS y DST. Se han encontrado concentraciones de 17β -estradiol (E_2), androstenediona, 5α -dihidrotestosterona (DHT), corticosterona, progesterona y testosterona (T) en la yema de huevo de reptiles (Conley et al., 1997; Janzen et al., 1998; Lovern & Wade, 2001; Elf, 2004; Huang et al., 2013; Carter et al., 2018).

La dinámica de transferencia de hormonas esteroides hacia la yema de huevo en reptiles, así como en especies ovíparas en general, aún no se encuentra completamente elucidada. Dado que las hormonas esteroides son lipofílicas, se ha propuesto que la transferencia materna (ya sea desde el plasma o desde las células esteroideogénicas) hacia los folículos ováricos durante la vitelogénesis ocurre de forma pasiva (Elf, 2003; Radder, 2007). No obstante, también se ha planteado la posibilidad de que éste sea un proceso dinámico y regulado, en el cual los niveles hormonales maternos y los de la yema puedan variar de manera independiente. En algunas especies de aves, se ha observado que la yema se deposita en capas, y que la concentración de hormonas esteroides en la yema reflejaría la historia de exposición a estas hormonas más que una correlación directa con los niveles maternos (Moore & Johnston, 2008). Además, existe evidencia de transferencia de esteroides posterior a la ovulación durante el tiempo que los huevos permanecen en el oviducto, como se ha documentado en el lagarto *Urosaurus ornatus*, lo cual es particularmente relevante en reptiles cuyos huevos pueden

permanecer en el oviducto durante varios días antes de la oviposición (Johnson & Moore, 2005; Fig. 2).

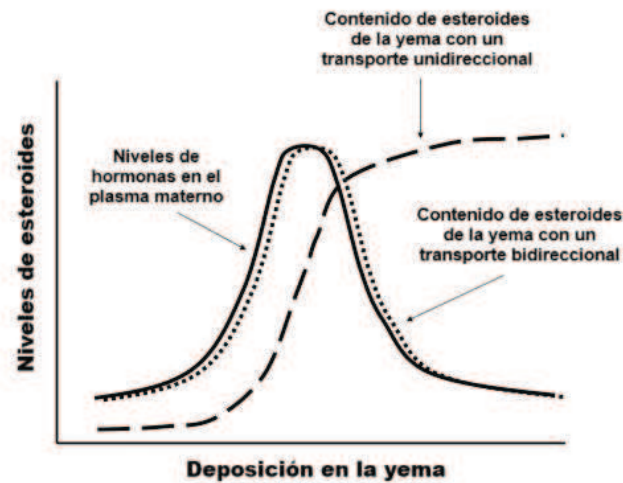


Figura 2: Modelos hipotéticos de deposición de hormonas esteroides maternas en la yema del huevo. La línea continua representa los niveles de esteroides circulantes en el plasma materno durante la deposición de hormonas en la yema. La línea punteada indica cómo variarían los niveles de esteroides en la yema si existiera un equilibrio con transporte bidireccional entre la yema y el plasma materno; en este caso, los niveles en la yema se correlacionarían con los niveles hormonales maternos. En cambio, la línea segmentada representa un modelo de deposición unidireccional, en el que los esteroides se acumulan en la yema reflejando la historia completa de exposición a esteroides maternos. Figura modificada de Moore & Johnston, 2008.

Estudios en los que los huevos fueron topicados con estrógenos exógenos, a temperaturas de incubación productoras de machos, dieron como resultado crías hembras. Lo mismo ocurrió con la aplicación de T ya que esta hormona puede ser metabolizada a E_2 por la enzima aromatasa P450 (Wibbels et al., 1991; Wibbels & Crews, 1992; Wu et al., 2022). Además, la dosis de hormonas esteroides requerida para sesgar el sexo de las crías hacia las hembras disminuye a medida que se acercan a las temperaturas pivotales (Rhen & Lang, 1994; Wibbels & Crews, 1994). Por otro lado, con el uso de inhibidores de la enzima aromatasa para bloquear la producción endógena de E_2 , existe un sesgo hacia la producción de machos a temperaturas de incubación pivotales, y la proporción de sexos a temperaturas de incubación de hembras también puede alterarse (Dorizzi et al., 1994; Wibbels & Crews, 1994; Wu et al., 2022). A su vez, la administración de andrógenos exógenos como DHT sólo altera la proporción de sexos a temperaturas pivotales de incubación (Wibbels & Crews, 1995). Los mecanismos de regulación de la enzima aromatasa en las gónadas embrionarias aún se desconocen, pero se cree que hay genes que codifican sensores que se activan a determinadas temperaturas dirigiendo el desarrollo de la gónada bipotencial hacia el desarrollo de los ovarios (Singh et al., 2020).

Debido a la capacidad de revertir el sexo de machos hacia hembras y como una forma de sesgar el sexo de las crías favoreciendo la producción de hembras, la administración de E₂ exógeno se ha propuesto como una forma alternativa para la recuperación de reptiles con DST en peligro de extinción y una mejora en el manejo de estas especies (Crews & Wibbels, 1993). Sin embargo, estudios en *Caiman latirostris* demostraron diferencias histológicas en el tamaño y la dinámica de crecimiento de los genitales y diferencias en la expresión de los receptores hormonales *Esr1* (receptor de estrógeno α) y *RA* entre las hembras producidas por la aplicación de E₂ y las hembras producidas naturalmente (Tavaliere et al., 2019). Además, un estudio en un reptil de vida corta (*Amphibolurus muricatus*) con DST, encontró que los machos producidos naturalmente tenían mayor éxito reproductivo que los machos que habían sido producidos a temperaturas de producción femenina con un inhibidor de la aromatasa (Warner & Shine, 2008). Por este motivo, es importante comprender el papel de estas hormonas, cómo influyen en la determinación del sexo en las especies con DST y los efectos que pueden tanto en el desarrollo embrionario como durante el crecimiento y la adultez.

En cocodrilos, así como en algunas especies de tortugas y lagartos con DST, la proporción sexual en las crías varía entre nidos, tanto en condiciones naturales como en incubaciones controladas a temperaturas que producen ambos sexos (Bull et al., 1982; Janzen, 1992; Ewert et al., 1994; Piña et al., 2003; Huang et al., 2013; Parachú-Marcó et al., 2017; Simoncini et al., 2019). Este patrón sugiere que la temperatura no es el único factor que interviene en la determinación sexual de estas especies. Diversos estudios han planteado que el genotipo del embrión podría influir en el sesgo sexual. Otros trabajos, en cambio, proponen que factores maternos no genéticos (como hormonas esteroides depositadas en la yema, ARN maternos, nutrientes o la elección del sitio de anidación) también podrían desempeñar un papel clave (Roush & Rhen, 2018). Sin embargo, en aves, una gran parte de las hormonas maternas depositadas en la yema del huevo se metabolizan en metabolitos no activos (es decir, no se unen a los receptores clásicos de hormonas esteroides) antes de llegar al embrión (Kumar et al., 2018; 2019; Mouton & Duckworth, 2021). Esto podría estar relacionado con un conflicto coevolutivo entre madres e hijos (Bebbington & Groothuis, 2021), en el que estos metabolitos podrían representar una vía complementaria mediante la cual influyen en el fenotipo del embrión pero no en la determinación del sexo (Mouton & Duckworth, 2021).

Rol de las hormonas esteroides en la determinación sexual de cocodrilianos

En *Alligator mississippiensis*, la androstenediona es el esteroide más abundante en la yema y el E₂ es el esteroide más variable entre los nidos. Una fuerte disminución en los niveles de esteroides en la yema coincide con el período de diferenciación gonadal en esta especie (Conley et al., 1997). En los cocodrilos, el suministro materno de hormonas esteroides es esencial porque el sistema endocrino no puede sintetizar E₂ y T durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, y la actividad de la

aromatasa en el complejo gónada-adrenal-mesonéfricos (GAM) aumenta luego del PTS durante el desarrollo embrionario (Smith & Joss, 1994a; Smith et al., 1995).

Estudios en *Caiman latirostris* evidenciaron diferencias en los genitales externos de hembras producidas a temperaturas de producción femeninas y las producidas por administración exógena de E₂, que podrían diferenciarse en términos de características histológicas, en la expresión de *Esr1*, *RA* y en la expresión de patrones moleculares en ovarios (Canesini et al., 2018; Tavalieri et al., 2019). Es importante prestar atención a estos cambios producidos por la aplicación de E₂ exógena en embriones porque la presencia de contaminantes ambientales en la naturaleza, que se comportan de manera similar a las hormonas esteroides en cuanto a que son capaces de afectar el normal funcionamiento del sistema endocrino, podrían causar desarrollo anormal de los genitales lo que a su vez podría provocar fallos reproductivos en los animales.

Metabolismo de hormonas esteroideas en la yema de huevo

Los esteroides maternos, como el E₂ y T, se metabolizan durante el desarrollo embrionario, con una disminución en sus niveles en las primeras etapas del desarrollo (Paitz & Bowden, 2009). El efecto de estos metabolitos, en su mayoría derivados de los estrógenos, ha sido ampliamente estudiado en tortugas (Marroquín-Flores et al., 2022; Paitz & Bowden, 2008; 2013; Paitz et al., 2012). Los estrógenos se convierten en compuestos sulfonados (Paitz & Bowden, 2008, 2013), mientras que los andrógenos, como T y androstenediona, se metabolizan en compuestos más solubles en agua, aunque aún no se han identificado. Se postula que estos podrían metabolizarse a DHT y etiocolanona (Kumar et al., 2019; Paitz & Bowden, 2013).

Metabolitos como el sulfato de estradiol y el sulfato de estrona, al igual que E₂, aumentan la producción de crías hembras y afectan la expresión de genes relacionados con la determinación del sexo (Marroquín-Flores et al., 2022; Paitz & Bowden, 2009). Marroquín-Flores et al. (2022) realizaron un estudio en el que agregaron concentraciones tóxicas no fisiológicas de sulfato de estrona a huevos de *Trachemys scripta*, antes del PTS, lo que resultó en una disminución en la expresión de *drmt1* y *sox9* y un aumento en *foxl2* y de la enzima aromatasa. Sin embargo, la expresión de *kdm6b* no se redujo en los embriones tratados con sulfato de estrona como ocurre con las temperaturas de producción femenina. Los mismos autores no encontraron ningún efecto sobre la expresión génica cuando los huevos fueron expuestos a concentraciones similares a las naturales, por lo que estos compuestos pueden tener una menor capacidad para inducir cambios moleculares en comparación con las hormonas esteroideas.

El sulfato de estrona podría facilitar el movimiento de esteroides hacia el embrión, ya que éste puede absorber estos metabolitos (Paitz et al., 2012). Aunque sus efectos están estudiados, aún no se conoce el mecanismo a través del cual actúan estos metabolitos y si se unen directamente a los receptores de esteroides (Paitz & Bowden, 2013). Es interesante observar que el aumento de la

actividad de la enzima sulfotransferasa (enzima que convierte los estrógenos en estrógenos sulfatados) coincide con la disminución de E_2 en los huevos de *Trachemys scripta* (Paitz & Bowden, 2008). Este podría ser un mecanismo para amortiguar el efecto directo de las hormonas esteroides maternas en el embrión, aunque no se sabe si estos metabolitos se transforman nuevamente en hormonas esteroides en el embrión, ya que esto aún no se ha demostrado experimentalmente.

Una revisión de Mouton & Duckworth (2021) en aves sugiere que estos esteroides maternos son precursores de metabolitos neuroactivos, por lo que podrían metabolizarse a neurotransmisores que no se unen a los receptores de esteroides clásicos. Esta vía podría ser otra forma de metabolizar los esteroides maternos y otra forma de influir en la fisiología de la descendencia, aunque en este caso en el desarrollo de los circuitos neuronales y no en la determinación del sexo.

Aunque las hormonas esteroideas se metabolizan durante el desarrollo, no se descarta que algunas de ellas lleguen al embrión y puedan tener un efecto directo (Fig. 3). Estos podrían metabolizarse y luego volver a su forma original dentro del embrión, además los mismos metabolitos podrían tener efectos (aunque moderados en comparación con sus predecesores) e influir en la determinación del sexo.



Figura 3: Posibles vías de metabolismo de hormonas esteroides maternas en la yema del huevo de reptiles. Las hormonas esteroides maternas podrían metabolizarse a varios compuestos antes de llegar al embrión y afectar el sexo de la cría. Estos metabolitos son compuestos más solubles en agua, lo que facilitaría su transferencia al embrión (Paitz & Bowden, 2008; Paitz & Bowden, 2013) y una parte podría llegar al embrión sin ser metabolizada.

Importancia de los lípidos en la reproducción y desarrollo embrionario de reptiles

Conocer la fisiología de lípidos en los reptiles es importante para comprender el almacenamiento y uso de energía, la biología reproductiva y la ecología de los mismos (Price, 2017). El tejido adiposo de los reptiles se puede localizar entre las fibras musculares, en la cola (Kwan,

1994), en algunas especies se pueden encontrar depósitos de grasas subcutánea, y muchos de ellos poseen lo que se denomina “cuerpo graso” abdominal que es la principal reserva de tejido adiposo en estas especies (Pond, 1978). Aunque los reptiles utilizan los depósitos de grasa durante los ayunos cortos y prolongados, se cree que estas reservas se utilizan principalmente con fines reproductivos.

Los lípidos invertidos en el huevo sirven como fuente de energía para el embrión en las especies lecitotróficas y para una eclosión exitosa (Speake & Thompson, 1999; Morales Arango et al., 2007). Los principales lípidos que componen la yema de huevo de cocodrilo son los triglicéridos y fosfolípidos (Noble et al., 1993a). Durante el desarrollo embrionario hay un consumo de los lípidos de la yema que es influenciado por la temperatura de incubación a la que se expone al embrión (Coe et al., 1988, Noble et al., 1993a). En *Alligator mississippiensis* el consumo de lípidos es mayor durante el último tercio del período de incubación y en los huevos que son incubados a 30°C (temperaturas de producción femeninas) quedan sin absorber el 15% de los lípidos, mientras que los que son incubados a 33°C (temperaturas productoras de machos) un 27% no se absorbe (Noble et al., 1993a). Además, Noble et al. (1993a) reportaron una marcada acumulación de ésteres de colesterol en la yema. Estos aumentan durante todo el período de incubación, acompañados por una disminución del colesterol libre, los fosfolípidos y los triglicéridos a medida que avanza el tiempo de incubación. Los autores discuten el hecho de que estos cambios coinciden con el PTS, por lo que podrían estar involucrados en la biosíntesis de hormonas esteroideas y tener una influencia sobre la determinación sexual.

Los cambios estacionales de los ácidos grasos sugieren que durante la época reproductiva los ácidos grasos de los depósitos lipídicos se movilizan al hígado y se depositan como triglicéridos para ser empaquetados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) antes de su deposición en los ovocitos (Price, 2017). Que la VLDL sea un precursor de la yema además de la vitelogenina, ha permitido que reptiles incorporen mayor cantidad de lípidos en sus huevos (Speake & Thompson, 1999).

Ácidos grasos: características y funciones biológicas

Los ácidos grasos son biomoléculas lipídicas que están formadas por una cadena hidrocarbonada lineal y un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo. Se diferencian por el número de átomos de carbono de la molécula, el número de dobles enlaces de la cadena hidrocarbonada, la posición y configuración de estos dobles enlaces (Sanhueza Catalán et al., 2015). Aquellos ácidos grasos que no poseen dobles enlaces en su estructura se denominan ácidos grasos saturados y aquellos que poseen dos o más dobles enlaces se denominan insaturados. Dependiendo de la orientación de los dobles enlaces que posean los ácidos grasos insaturados se pueden clasificar en *cis* o *trans*. Sin embargo, en la naturaleza la mayoría se encuentra como *cis* (Enríquez et al., 2003). También se utiliza la nomenclatura omega (ω), o “n” para determinar la posición del doble enlace, contando desde el

grupo metilo. Esto permite clasificar a los ácidos grasos como n-9, n-6 y n-3 (Cabezas-Zábala et al., 2016).

El ácido graso más importante de la familia n-3 es el ácido α -linolénico (18:3 n-3, ALN), el más importante de la familia n-6 es el ácido linoleico (18:2 n-6, AL) y el de la serie n-9 es el ácido oleico (18:1 n-9, AO) (Bonomo & Uauy, 2005). Tanto AL como ALN se consideran ácidos grasos esenciales debido a que la mayoría de los animales vertebrados carecen de enzimas para sintetizarlos (con excepción de algunos ectotermos, Arnold et al., 2015), sólo pueden introducir insaturaciones a partir del carbono 9. Por esta razón, deben ser incorporados en proporciones adecuadas en la dieta (Bonomo & Uauy, 2005). A partir de procesos de elongación y desaturación, estos ácidos grasos forman otros ácidos grasos de mayor tamaño de cadena y con un mayor número de insaturaciones, estos son los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga (Fig. 4).

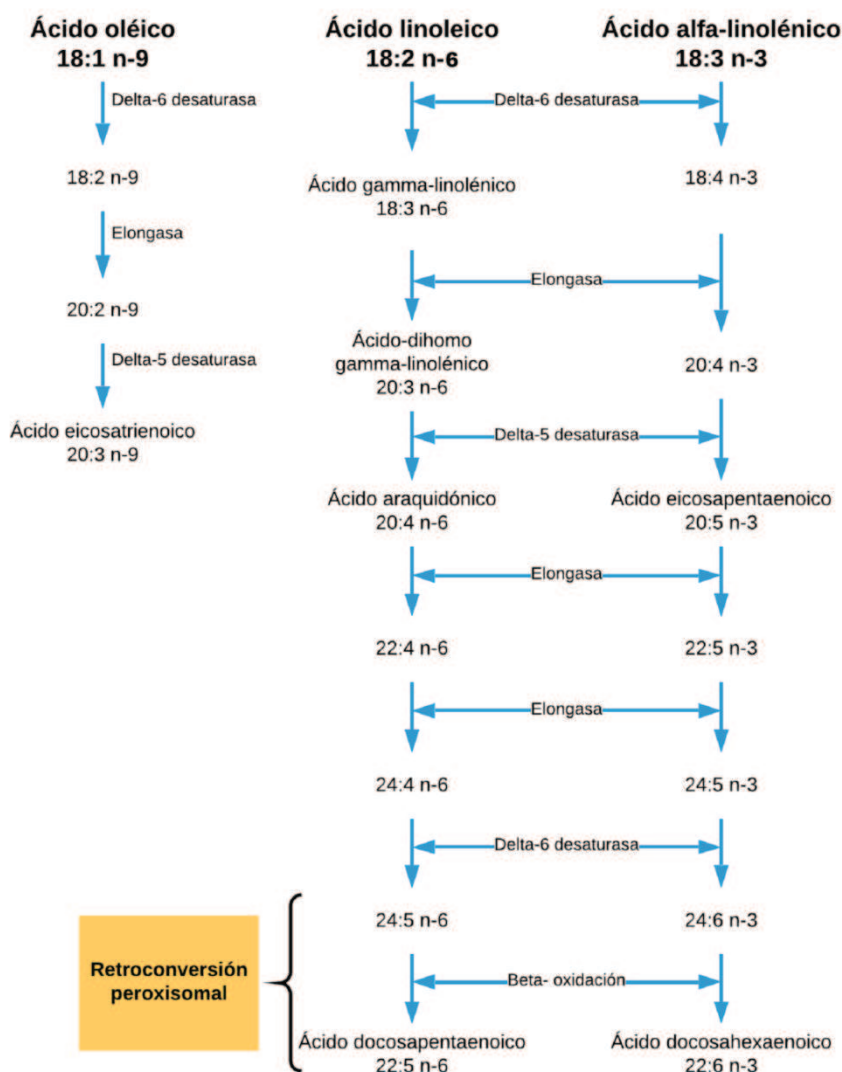


Figura 4: Vía de desaturación del ácido oléico, ácido linoleico y ácido α -linolénico.

Los ácidos grasos forman parte de los lípidos de las membranas biológicas como los fosfolípidos, esfingolípidos y gangliósidos (De Carvalho & Caramujo, 2018), por lo que forman una barrera protectora que controla el tránsito de componentes desde y hacia la célula e influyen en su fluidez. Los ácidos grasos de cadena larga y con mayor grado de insaturaciones hacen que la membrana sea más fluida que aquellos ácidos grasos que son saturados y de cadena corta (Ibarguren et al., 2014). Esta propiedad es importante en los eucariotas poiquilothermos, ya que, frente a un estrés provocado por bajas temperaturas, pueden modificar los lípidos de las membranas aumentando el grado de insaturación de los ácidos grasos. Esto facilita el tránsito de componentes a través de la membrana y, por lo tanto, permite que los procesos celulares sigan funcionando correctamente, incluso a temperaturas bajas (Guschina & Harwood, 2006). Otra función que poseen en la membrana es regular la comunicación celular, por ejemplo, los AGPI disminuyen el espesor de la membrana y producen deformaciones de lípidos favoreciendo la inserción de ciertas proteínas anfipáticas y procesos de endocitosis (Pinot et al., 2014).

Otras de las funciones importante que poseen los ácidos grasos dentro de las células es la regulación de ciertos genes, ya que actúan como ligandos de los receptores de los proliferadores peroxisomales, conocidos como PPAR que son reguladores de procesos metabólicos y celulares (Echeverría et al., 2016), también son partes de lípidos que forman gotitas lipídicas que secuestran compuestos tóxicos para proteger a las células que también absorben y transportan vitaminas y proteínas (Murphy et al., 2008; Walther & Farese, 2012; Henne et al., 2018).

Descripción de la especie *Caiman latirostris*

En Argentina habitan dos especies del género caimán, el yacaré overo (*Caiman latirostris*) y el yacaré negro (*C. yacare*). Ambas especies se distribuyen por el centro-norte del país, siendo el yacaré overo quien presenta una distribución más austral ya que posee una mayor tolerancia climática (Waller & Micucci, 1992). *Caiman latirostris* es una especie de cocodriliano endémico de América del Sur, cuya distribución abarca Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Fig. 5). En Argentina se ha registrado la presencia de *C. latirostris* en las provincias de Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta y Santa Fe (Larriera & Imhof, 2000). Sus hábitats de preferencias son las aguas con vegetaciones flotantes (embalsados) y poco profundas, que son de difícil acceso para los predadores y tienen la característica de ser ricos en alimentos (Messel et al., 1995).

En cuanto a su estado de conservación, la especie es considerada de preocupación menor por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). En la actualidad la caza ilegal no es la principal amenaza para la especie, si no la degradación de su hábitat por parte del sector agrícola (Larriera & Imhof, 2000). Durante la incubación y el primer año de vida se calcula que mueren entre

el 90% y el 98% de los individuos a causa de factores como la predación y condiciones climáticas como inundaciones, sequías y frío (Larriera & Piña, 2000; Viotto et al., 2022; Pierini et al., 2024).

Biología reproductiva

Los individuos de esta especie comienzan a reproducirse alcanzan la madurez sexual, aproximadamente a los 10 años (Verdade & Sarkis, 1998), y su temporada reproductiva es anual (Fig. 6, A y B). Las hembras reproductoras son de clase III, dentro de esta categoría se encuentran los caimanes con una longitud entre 68 y 99,9 cm de longitud hocico-cloaca (Leiva et al., 2018a). Se ha reportado la puesta de nido de una hembra de 5 años en cautiverio con tamaño de longitud hocico-cloaca (LHC) de 81 cm y masa corporal de 19,8 kg (Verdade et al., 2003). Se debe tener en cuenta que los caimanes en cautiverio crecen a un ritmo más acelerado que los caimanes salvajes debido a la disponibilidad de alimento y es debido a esto que podrían alcanzar el tamaño necesario para poder reproducirse antes que los animales salvajes (Leiva et al., 2018a). Además, la clase III incluye machos reproductivos y la clase VI (LHC mayor a 99,9 cm) sólo incluye machos grandes reproductivos, ya que no hay reportes de hembras de este tamaño.



Figura 5: Distribución geográfica del yacaré overo (*Caiman latirostris*) en América del Sur. Figura obtenida de Verdade et al., 2010.

En los meses de septiembre y octubre los animales comienzan a alimentarse, las hembras con el fin de producir huevos y los machos de defender los territorios. Las cópulas se inician a finales de octubre y principios de noviembre, momento en el que las hembras comienzan la construcción de los

nidos para realizar la postura de huevos por única vez en el año (Piña, 2002; Piña et al., 2004). Durante la temporada reproductiva Portelinha et al. (2015) observaron que las hembras reproductivas tienen niveles séricos de E_2 y progesterona más altos que aquellas hembras no reproductivas.

Las posturas se realizan por la noche y cada hembra deposita un promedio de 33,1 huevos por nido (Piña, 2002; Simoncini et al., 2009). La construcción del nido se lleva a cabo en varios días donde la hembra forma un montículo con material vegetal y tierra, en ambientes como sabana, monte y embalsado (Montini et al., 2006). Durante la incubación la hembra atiende al nido con el fin de mantener las condiciones necesarias de temperatura y humedad y para defenderlo, sin tener contacto con los huevos hasta la eclosión (Piña, 2002; Ojeda Adame et al., 2018; Pierini et al., 2022). Generalmente el período de incubación oscila entre 65 y 80 días (Piña et al., 2003) y las crías nacen en los meses de febrero y marzo con un peso promedio de 40 g y una longitud de 22 cm (Larriera & Imhof, 2006).



Figura 6: Ejemplares de hembras reproductoras de *Caiman latirostris*. En las figuras: A) una hembra reproductora del semicautiverio perteneciente al Centro de Rescate, Interpretación e Investigación de Fauna La Esmeralda (CRIIF), B) hembras reproductoras defendiendo un nido. Fuente A): Facebook Proyecto Yacaré.

Determinación sexual por temperatura en Caiman latirostris

Esta especie presenta un patrón de determinación sexual por temperatura denominada FMF en donde a temperaturas constantes entre 29 y 31 °C se producen 100% hembras y entre 33 y 34 °C 100% machos (Piña et al., 2003; Iungman & Piña, 2013; Parachú-Marcó et al., 2017). Entre 34 y 34,5°C se produce una transición de la producción de crías machos a hembras, pero el éxito de eclosión y supervivencia es menor a estas temperaturas (Piña et al., 2003; Parachú-Marcó et al.,

2017). Por lo tanto, se pudieron distinguir dos temperaturas pivotales, una temperatura pivotal inferior entre los 32 y 33°C y una superior entre 34 y 34,5°C (Parachú-Marcó et al., 2017).

Los nidos incubados a 29°C completan el desarrollo en 81 días, los incubados a 31°C en 73 días y a 33°C en 70 días (Piña et al., 2003; Fig. 7, A y B). La temperatura influye sobre el período de incubación haciendo que los nidos incubados a temperaturas más altas tengan un desarrollo embrionario más acelerado, que podría deberse a un aumento del metabolismo producido por la temperatura (Zug et al., 2001). *Caiman latirostris* presenta un PTS que ocurre en el segundo tercio del período de incubación que se localiza entre los estadios 19 y 24 (Piña et al., 2007).



Figura 7: Crías de *Caiman latirostris*. A) Cría de *C. latirostris* al momento de la eclosión, B) ejemplar de recién eclosionado de *C. latirostris*.

Desarrollo embrionario

Los huevos de cocodrilianos están compuestos por yema, albumen y una cáscara calcificada, los cuales proporcionan al embrión los nutrientes, minerales y parte del agua necesarios para su desarrollo. Todo el contenido del huevo está envuelto por una membrana delgada llamada corion. La yema se encuentra contenida dentro del saco vitelino, mientras que el embrión se desarrolla en el interior del saco amniótico, rodeado por una membrana protectora denominada amnios. Durante las primeras etapas del desarrollo, los intercambios de gases ocurren principalmente por difusión. Sin embargo, a medida que el embrión crece, se forma un sistema circulatorio extraembrionario que permite un intercambio más eficiente de oxígeno, la absorción de nutrientes y la excreción de

desechos. Estos productos de desecho son almacenados en el saco alantoideo, una membrana extraembrionaria que se origina como una evaginación del intestino (Grigg & Kirshner, 2015; Fig. 8).

Lungman et al. (2008) describieron las diferentes etapas del desarrollo embrionario en *Caiman latirostris* en 28 estadios, basándose en las características morfológicas y morfométricas de los embriones incubados a 31 °C. En el estadio 2 de desarrollo, ya se observa en las estructuras extraembrionarias el blastodermo, rodeado en su mitad posterior por islas sanguíneas. En cuanto a las características craneales, el neuroporo anterior se encuentra en proceso de cierre, y se observan 20 pares de somitos dispuestos a ambos lados de la médula espinal. Pronto se desarrollan las estructuras extraembrionarias como el alantoides y se observan los primeros vasos sanguíneos (estadios 4–5). El cuerpo del embrión se rota hacia la derecha, se inician las fosas nasales y el desarrollo de los maxilares (estadios 5–7), mientras que el alantoides se fusiona con el corion (estadio 8). El hígado aparece como una protuberancia debajo del corazón (estadio 9). Durante los estadios 12 a 15, el embrión se flexiona completamente (cabeza tocando la cola), los brotes de las extremidades se alargan, los ojos desarrollan pigmentación, y se definen las fosas nasales. Posteriormente, el cuerpo se desproporciona menos con respecto a la cabeza, aparecen los primeros dentículos y los dedos comienzan a delimitarse (estadios 17–19). En los estadios 20–21, el hocico se alarga, las mandíbulas se completan, los vasos sanguíneos rodean el saco vitelino y se extienden hacia la alantoides. Las escamas ya son visibles en el cuerpo y la pigmentación comienza a distribuirse por la cabeza, el cuerpo y las extremidades. A partir del estadio 23, aparece el diente de huevo, las garras están formadas y se establece el patrón de escamas. En el estadio 24, la pigmentación es más intensa, de color verde-negruzco, y las escamas cubren toda la superficie. Desde el estadio 25 hasta el 28, el embrión ya se asemeja a una cría. La cáscara se vuelve opaca, aún hay yema externa adherida (estadio 25), y se inicia la absorción progresiva de la yema hasta quedar completamente dentro del cuerpo, dejando una cicatriz umbilical (estadios 27–28). En esta última etapa ya no se observan grandes cambios morfológicos, y el embrión se prepara para la eclosión.

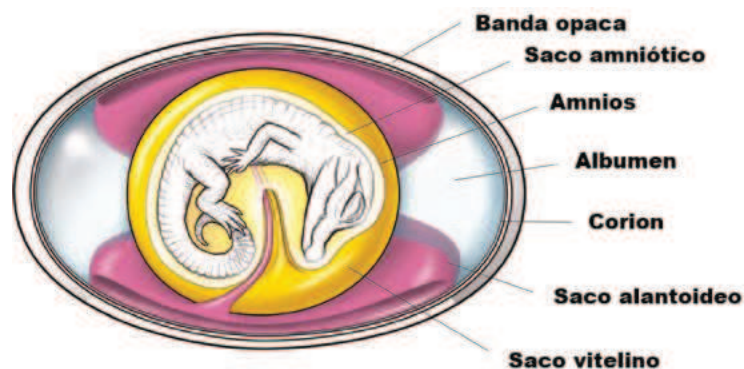


Figura 8: Representación esquemática del huevo de cocodrilianos. Figura modificada de Grigg & Kirshner, 2015.

Impacto del cambio climático y variables climáticas sobre la biodiversidad: importancia de su estudio en reptiles

El cambio climático de origen antropogénico avanza a un ritmo alarmante, y se prevé que, de no tomarse medidas de mitigación efectivas, las temperaturas globales aumenten al menos 4 °C durante este siglo (Stocker, 2014). Este fenómeno conlleva consecuencias ambientales, entre ellas el incremento de la temperatura superficial, la intensificación de eventos climáticos extremos como sequías e inundaciones, el aumento del nivel del mar, la acidificación de los océanos y la pérdida de ecosistemas (Du et al., 2023). Se estima que para mediados del siglo XXI el cambio climático será una de las principales causas de pérdida de biodiversidad (Pereira et al., 2024). Las especies pueden verse afectadas por el cambio climático de forma directa, por ejemplo, a través del estrés térmico o la pérdida de hábitats, o de manera indirecta, mediante la alteración en la disponibilidad de alimentos o el aumento de la incidencia de enfermedades (Pounds et al., 2006; Fukuda et al., 2022; Powell et al., 2023).

Uno de los principales moduladores del clima global es el fenómeno El Niño/Oscilación del Sur (ENOS), caracterizado por fluctuaciones en la temperatura del océano Pacífico central y ecuatorial que alteran los patrones atmosféricos a escala global (Servicio Meteorológico Nacional Argentino). Este fenómeno comprende tres fases: El Niño, La Niña y la fase neutra. En Argentina, la fase La Niña suele generar una disminución significativa de las precipitaciones, con eventos extremos de sequía, mientras que El Niño provoca un aumento de las lluvias (De la Casa & Ovando, 2006; Bianchi & Cravero, 2010). Estos efectos se manifiestan con mayor intensidad durante el verano y son particularmente marcados en la región del Litoral. Un episodio prolongado de La Niña afectó a Argentina entre 2020 y 2023 (Tabla 3).

Tabla 3: Valores del índice multivariado ENOS (El Niño/Oscilación del Sur) bimensuales (MEI v2).

Año	DE	EF	FM	MA	AM	MJ	JJ	JA	AS	SO	ON	ND
2020	0.3	0.3	0.1	-0.1	-0.2	-0.7	-0.9	-1	-1.1	-1.2	-1.1	-1.1
2021	-1.2	-1	-0.8	-0.9	-1.1	-1	-1.4	-1.3	-1.4	-1.5	-1.4	-1.2
2022	-1	-1	-1.3	-1.6	-1.6	-1.9	-2.2	-1.7	-1.7	-1.7	-1.5	-1.3
2023	-1.1	-0.9	-0.8	-0.4	-0.1	0.4	0.5	0.5	0.7	0.5	0.9	1.1
2024	0.7	0.7	0.8	0.3	0.1	-0.2	-0.7	-0.7	-0.6	-0.5		

En color rojo los períodos cálidos pertenecientes al fenómeno La Niña, en azul los períodos fríos pertenecientes al fenómeno El Niño, y en negrita los períodos de fase neutra. DE: diciembre-enero, EF: enero-febrero, FM: febrero-marzo, MA: marzo-abril, AM: abril-mayo, MJ: mayo-junio, JJ: junio-julio, JA: julio-agosto, AS: agosto-septiembre, SO: septiembre-octubre, ON: octubre-noviembre, ND: noviembre-diciembre. Fuente: <https://psl.noaa.gov/enso/mei/>

El cambio climático ya está afectando a las poblaciones de anfibios y reptiles (Winter et al., 2016), siendo los reptiles tropicales especialmente vulnerables debido a su dependencia de la temperatura ambiental (Deutsch et al., 2008; Simpkins, 2023). Se estima que aproximadamente el 52,1 % de las especies de reptiles ya han perdido parte de su área de distribución, en muchos casos como consecuencia de estos cambios climáticos (Li et al., 2024). Dado este contexto, los estudios ecológicos que analizan la influencia de las variables climáticas sobre los reptiles resultan fundamentales, ya que permiten comprender cómo fenómenos como el cambio climático y los eventos extremos asociados (por ejemplo, ENOS) impactan en aspectos clave de su biología, como: distribución, comportamiento, reproducción y supervivencia (Li et al., 2024). Esta información es crucial para diseñar estrategias de conservación efectivas, especialmente para especies sensibles al clima o con rangos geográficos restringido.

En este marco, y considerando cómo las condiciones ambientales afectan la reproducción de *Caiman latirostris*, surge la necesidad de integrar las variables climáticas con los procesos fisiológicos maternos y moleculares que influyen en la determinación sexual. En conjunto, este estudio parte de la premisa de que las hembras tienen el potencial de modular el destino sexual de su progenie mediante la deposición de hormonas esteroides y ácidos grasos en el huevo, y que esta inversión puede verse alterada por las condiciones climáticas previas a la postura. Estos componentes maternos actuarían sobre la maquinaria molecular del embrión (enzimas esteroidogénicas y redes génicas asociadas al desarrollo gonadal), generando variación en la proporción sexual entre nidos y temporadas. Este mecanismo integrador constituye la base conceptual que guía las hipótesis evaluadas en este trabajo (Fig. 9).



Figura 9: Esquema conceptual sobre cómo las condiciones climáticas modulan la inversión materna y la determinación sexual. E₂: 17β-estradiol, T: testosterona. La inversión materna hormonal y energética (ácidos grasos) en los huevos de *Caiman latirostris*, modulada por las condiciones climáticas previas a la postura, influye de manera conjunta en la expresión enzimática gonadal durante el período termosensible del desarrollo, determinando la proporción sexual de la nidada.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el efecto de la inversión materno-hormonal y del ambiente sobre la determinación sexual de *Caiman latirostris*.

Objetivos específicos

1. Evaluar la inversión materno-hormonal y de ácidos grasos en huevos de *Caiman latirostris* entre nidos diferentes.
2. Evaluar la influencia de la inversión materno-hormonal y energética (ácidos grasos) en la proporción sexual de la nidada de *Caiman latirostris*.
3. Evaluar la influencia de las condiciones climáticas de la temporada reproductiva en la inversión hormonal por parte de la madre sobre la progenie.
4. Determinar y relacionar la expresión enzimática en las gónadas durante el periodo termosensible, con la carga hormonal y la proporción sexual de la nidada.
5. Analizar si existe relación entre la inversión hormonal, energética (ácidos grasos), y la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo de andrógenos y estrógenos.

Hipótesis

1. La inversión materna hormonal en su nidada es homogénea, por lo cual la carga hormonal entre los huevos de un nido será similar, pero será diferente entre nidos, y se verá reflejado en la proporción sexual de las crías.
2. La inversión materna hormonal en el huevo afecta la expresión enzimática en las gónadas del embrión durante el desarrollo embrionario, influyendo sobre la determinación sexual.
3. La inversión materna hormonal y energética en los huevos de la nidada, está influenciada por las condiciones climáticas (precipitaciones y temperaturas) durante los meses previos a la postura.

Capítulo 1: Inversión materna de ácidos grasos y hormonas esteroides y su relación con la determinación sexual por temperatura de *Caiman latirostris*

1.1. Introducción

La inversión materna en especies ovíparas se produce principalmente a través del contenido de vitelo y albúmina del huevo, donde las madres le transfieren al embrión recursos necesarios para su desarrollo (Thompson & Speake, 2004; Nelson et al., 2010). Esta inversión tiene efectos sobre el embrión causando cambios en el fenotipo de la descendencia, y se considera de los más influyentes (Marshall & Uller, 2007). Los componentes principales de la yema de huevo de reptiles son lípidos y proteínas (Noble et al., 1991), siendo la cantidad de lípidos aproximadamente el doble que el de proteínas en la mayoría de las especies ovíparas (Thompson & Speake, 2002). En cocodrilianos, la fracción lipídica de la yema le proporciona al embrión la energía necesaria para su desarrollo y una eclosión exitosa (Noble et al., 1993a; 1993b; Morales-Arango et al., 2007). Además, la calidad de inversión de ácidos grasos de la yema es de gran importancia ya que se ha demostrado que influye sobre el tamaño, crecimiento de las crías, e incluso reflejan la inversión materna (Speake et al., 1994; Haeussner et al., 1996; Leiva, 2019).

Estudios previos han descrito las características fisicoquímicas de los huevos del yacaré overo (*Caiman latirostris*), así como la inversión de ácidos grasos en la yema (Leiva et al., 2018b; Leiva, 2019). Estos estudios señalan que existen diferencias entre nidos en cuanto al perfil de ácidos grasos, mientras que los huevos de un mismo nido presentan composiciones similares entre sí. Sin embargo, algunos nidos muestran una mayor variabilidad intranidada. Por otra parte, también encontraron que el perfil de ácidos grasos de la yema difiere del observado en el músculo y el plasma sanguíneo de las madres, aunque se asemeja más al del músculo que al del plasma. Esto sería a causa de que el perfil de ácidos grasos del músculo refleja la ingesta de alimentos consumidos con anterioridad (y en el momento de la vitelogénesis) en comparación con el perfil de ácidos grasos del plasma que refleja la ingesta reciente de alimentos (Leiva, 2019).

Las hembras de cocodrilianos también depositan hormonas esteroides en la yema de huevo, como androstenediona, estradiol (E_2), progesterona y testosterona (T) (Conley et al., 1997; Hamlin et al., 2010). Esta asignación de hormonas maternas influye en el desarrollo de la descendencia en diversas especies, afectando aspectos como el crecimiento, la supervivencia y el comportamiento (Eising et al., 2006; Gagliano & McCormick, 2009; Warner et al., 2009; Tissier, Williams & Criscuolo, 2014). En reptiles, las hormonas esteroides tienen la capacidad de incidir en la determinación sexual de la descendencia en especies con determinación sexual por temperatura (DST). En particular, el E_2 puede inducir la feminización incluso a temperaturas productoras de machos, y su efecto es dosis-dependiente y sinérgico con la temperatura (Crews et al., 1991; Wibbels et al., 1991; Crain et al., 1997; Stoker et al., 2003). Sin embargo, la T no logra revertir el sexo de la

descendencia cuando se incuban nidos a temperaturas productoras de hembras (Rhen & Lang, 1994), pero a temperaturas donde se producen ambos sexos, al igual que el E₂, feminiza a la descendencia (Wibbels & Crews, 1995). Si bien queda claro el efecto de las dosis suprafisiológicas, pocos estudios han abordado el efecto de las concentraciones fisiológicas de las hormonas esteroides en las especies con DST.

Los ácidos grasos libres aportados por la dieta afectan diversos aspectos del metabolismo hormonal, incluyendo la esteroidogénesis, la secreción y la biodisponibilidad de hormonas esteroides en los tejidos (Gromadzka-Ostrowska, 2006; Zhou et al., 2022). Esto se debe a que interfieren en la unión de estrógenos y andrógenos a las proteínas plasmáticas (Mooradian et al., 1988; Watanabe et al., 1990), en la actividad de las enzimas involucradas en su síntesis y metabolismo (Meikle et al., 1996; Marinero et al., 1998), y en su capacidad de unirse a los receptores específicos (Chung et al., 2001; Gromadzka-Ostrowska, 2006). En aves, por ejemplo, la calidad de la dieta ingerida por la hembra incrementa la deposición de hormonas como T y dihidrotestosterona (DHT) en la yema de huevo (Rutstein et al., 2005). Por lo tanto, es crucial determinar si la inversión de ciertos ácidos grasos en la yema del huevo de caimanes modula las hormonas esteroides depositadas, y cómo esta modulación podría influir en la determinación sexual de *Caiman latirostris*.

En este contexto, el objetivo de este capítulo es analizar la inversión materna de hormonas esteroides y ácidos grasos, y su influencia en la determinación sexual de la descendencia de *Caiman latirostris*. Además, evaluar si existe una relación entre las concentraciones de hormonas esteroides y los perfiles de ácidos grasos, así como con las variables morfométricas del huevo y el tamaño de la postura de los nidos. Este enfoque permitirá comprender cómo la inversión materna en la yema del huevo, a través de la transferencia de hormonas y ácidos grasos, influye en el desarrollo embrionario, con un énfasis particular en la determinación sexual.

1.2. Objetivos

- Evaluar la inversión materno-hormonal y de ácidos grasos en huevos de *Caiman latirostris* entre nidos diferentes.
- Determinar las diferencias en la inversión de hormonas esteroides y ácidos grasos entre nidos provenientes de la naturaleza y del semicautiverio.
- Evaluar la influencia de la inversión materno-hormonal y energética (ácidos grasos) en la proporción sexual de la nidada de *Caiman latirostris*.

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Recolección de nidos y obtención de muestras

Los huevos de *Caiman latirostris* fueron colectados al comienzo de la temporada reproductiva (diciembre y enero) en los años 2020, 2021, 2022 y 2023 en zonas de relevamiento del Proyecto Yacaré. Los nidos provenían de diferentes localidades de la provincia de Santa Fe: Cacique Ariacaiquín (Departamento de San Javier), Los Amores (Departamento Vera), Santurce (Departamento San Cristóbal), (Fig. 10 A) y nidos del semicautiverio en la estación experimental Centro de Rescate, Interpretación e Investigación de Fauna La Esmeralda (CRIIF) ubicada en la localidad de Santa Fe (Departamento La Capital) (Fig. 10 B).

Los huevos colectados de los nidos se marcaron con un óleo pastel para mantener la posición original, y de esta manera no ocasionar daños al embrión. Luego se trasladaron en recipientes plásticos con material vegetal provenientes del nido, para evitar su movimiento, hasta las instalaciones del Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados – FHUC; UNL / MASPyMA. Para los huevos de cada nido, se registraron: 1- sus variables morfométricas (largo y ancho) con un calibre (precisión 1 mm) y su peso con balanza (precisión 0,1 g) y 2- el estadio de desarrollo y la viabilidad de los embriones mediante la inspección de la banda opaca del huevo (Iungman et al., 2008) (Fig. 11 A, B y C).



Figura 10: Colecta de nidos de *Caiman latirostris*. A) Colecta de nido en la naturaleza en la localidad de Los Amores, B) Colecta de nido y marcación de huevos en el Centro Rescate, Interpretación e Investigación de Fauna La Esmeralda (CRIIF).

De los nidos que presentaron un desarrollo menor a cinco días se utilizaron tres huevos de los cuales se obtuvo la yema. El resto de los nidos se incubaron a una temperatura de 32°C constante, que

fue descrita como una temperatura productora de ambos sexos en esta especie (Parachú-Marcó et al., 2017)(Fig. 11 D). Se utilizaron tres incubadoras (SEMEDIC, I-290D) programadas a $32 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Los huevos fueron colocados en bandejas plásticas que contenían vermiculita hidratada, con aproximadamente seis huevos por bandeja (Fig. 12). Las bandejas que contenían huevos de un mismo nido fueron distribuidas entre las tres incubadoras, de modo que cada incubadora recibió un porcentaje representativo de cada nidada. La temperatura de cada incubadora se monitoreó utilizando registradores HOBO (Onset Computer, Pocasset, MA) colocados dentro de frascos de vidrio, los cuales registran la temperatura cada 15 minutos. Además, tres veces por semana se verificó el funcionamiento de los registradores HOBO para asegurar el correcto desempeño de las incubadoras, y se realizaron riegos para mantener la humedad de la vermiculita, junto con la rotación de las bandejas plásticas que contenían los huevos, a fin de modificar su posición dentro de las incubadoras (Fig. 13).



Figura 11: Ovoscopia, mediciones morfométricas e incubación de huevos. A) Ovoscopia de un huevo para verificar su viabilidad mediante la observación de la presencia de la banda opaca, B) pesado del huevo con balanza de precisión, C) mediciones de largo y ancho del huevo con calibre, D) interior de la incubadora donde se alojaron los huevos durante el periodo de incubación; en el estante superior se observa una bandeja con agua para mantener la humedad y el dispositivo HOBO utilizado para registrar la temperatura.



Figura 12: Recipientes plásticos con vermiculita húmeda en los que se colocaron los huevos de *Caiman latirostris* para su incubación.

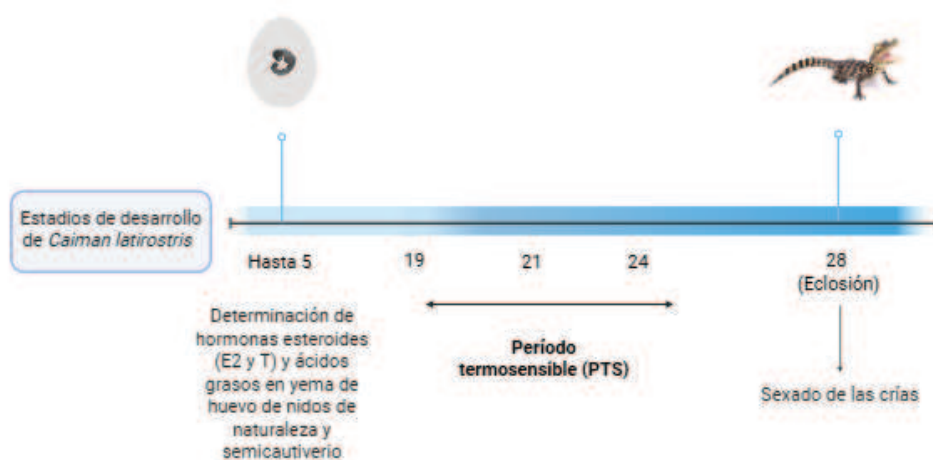


Figura 13: Esquema metodológico del proceso de muestreo realizado durante el estudio.

1.3.2. Sexado de los animales

Para determinar el sexo de las crías se realizó la inspección de las gónadas bajo lupa microscópica para corroborar la presencia o ausencia del conducto de Müller: su presencia indica que la cría es hembra. Este trabajo fue supervisado y aprobado por el Comité de Ética y Seguridad en el Trabajo Experimental de CONICET, Res 801/2015.

1.3.3. Procesamiento de muestras en laboratorio

1.3.3.1. Perfil de ácidos grasos de la yema de huevo

Se analizó el perfil de ácidos grasos de la yema del huevo utilizando la técnica de extracción propuesta por Hara & Radin (1978). Para ello, se tomó 1 g de yema, al que se adicionaron 3 ml de una mezcla de hexano:isopropanol (3:2, v/v) y de sulfato de sodio al 6%. La mezcla se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min y se trasvasó la fase superior a un nuevo tubo, donde se eliminó el solvente mediante evaporación a 40 °C con corriente de nitrógeno. La fracción lipídica restante se resuspendió en hexano y se sometió a una transesterificación con hidróxido de potasio en metanol (1,12 g de hidróxido de potasio en 10 ml de metanol). Tras centrifugar nuevamente a 3500 rpm durante 10 min, se recuperó la fase superior para la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Finalmente, los FAME se identificaron mediante cromatografía gaseosa, comparando sus tiempos de retención relativos con estándares comerciales. El equipo utilizado fue un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas Perkin-Elmer Clarus® 600 (GC/MS) con una columna capilar fusionada de 60 m con un diámetro interno de 0,25 mm (polietilenglicol, Perkin Elmer Elite-WAX) y helio como gas portador. La cuantificación de ácidos grasos fue llevada a cabo mediante normalización del área de los picos de cada FAME identificado.

Para evaluar la inversión materna de ácidos grasos se seleccionaron al azar cuatro nidos de cada origen (naturaleza y semicautiverio), utilizando un total de nueve huevos por origen. En este caso resulta importante definir el concepto de semicautiverio. A diferencia del cautiverio estricto, el semicautiverio implica que, si bien los animales se encuentran en un territorio delimitado por barreras físicas, se procura emular las condiciones naturales de su hábitat. Para este estudio se obtuvieron los nidos del semicautiverio del Centro de Rescate, Interpretación e Investigación de Fauna La Esmeralda (CRIIF) que alberga un total de 35 individuos adultos de yacaré overo. El lugar donde se mantienen los animales consta de un recinto circular de 70 m de diámetro, con una superficie total de 3.800 m², que incluye una laguna y vegetación (Pierini et al., 2022) (Fig. 14). Se colectaron 5 nidos del semicautiverio y 6 nidos de la naturaleza, extrayendo 3 huevos por nido para realizar las determinaciones. Cabe destacar que originalmente se colectaron 6 nidos del semicautiverio; sin embargo, uno fue descartado por corresponder a una doble postura (dos nidos de diferentes hembras en el mismo montículo vegetal).



Figura 14: Individuos de *Caiman latirostris* en el semicautiverio en el Centro de Rescate, Interpretación e Investigación de Fauna La Esmeralda (CRIIF).

1.3.3.2. Determinación de hormonas esteroides en yema del huevo

Para determinar la concentración de hormonas esteroides en yema se realizó una extracción previa para eliminar lípidos y proteínas que puedan estar unidos a las hormonas y puedan interferir en la unión al anticuerpo (Kozlowski et al., 2009). Fueron comparadas dos metodologías diferentes de extracción, descritas por Guibert et al. (2010) y Hamlin et al. (2010), además para la androstenediona también se evaluó la metodología descrita por Schwabl (1993). Con estas dos metodologías se trabajó en muestras de yema de huevo con diferentes diluciones. La técnica elegida para continuar con las extracciones de E₂ fue la de Guibert et al. (2010) con algunas modificaciones. A la muestra de yema de huevo se la diluyó al medio con agua destilada y se le agregó 4 ml de metanol para extraer las hormonas esteroides. Esta mezcla fue homogeneizada con vortex, luego se dejó reposar unos minutos hasta diferenciar dos fases y se llevó a -20°C toda la noche para lograr la precipitación de lípidos. Al día siguiente se centrifugó y se tomaron muestras de una alícuota de 50 µl, luego el solvente fue evaporado completamente en un baño maría. El extracto seco se reconstituyó en suero fisiológico (NaCl 0,9%) para su determinación mediante electroquimioluminiscencia.

Para la medición de T en la yema de huevo se empleó una solución patrón de concentración conocida de T, ya que a pesar de haber empleado diferentes técnicas de extracción, las mediciones resultaron estar por debajo del límite de detección. Se agregó a todas las muestras 5 µl de una solución patrón de T de 50 ng y se dividieron todos los resultados por el valor de la muestra que tuvo

la menor concentración de T. De esta manera, se obtuvieron concentraciones relativas y no absolutas de las concentraciones de T en la yema.

Tanto para E₂ como para T se calcularon los coeficientes de variación inter e intra-ensayo (Ecuación 1). Para E₂ el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 8,57% y el de inter-ensayo fue de 11%. Para la T el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 9,12% y el de inter-ensayo fue de 19,48%.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvío estándar}}{\text{Media}} * 100 \quad (1)$$

Se realizaron tres experimentos diferentes para estudiar las hormonas esteroides en yema de huevo. En primer lugar, se llevó a cabo un experimento preliminar para evaluar posibles gradientes hormonales en la yema de huevo. Para ello, se eligieron 3 nidos al azar y 3 huevos de cada nido; de cada huevo se obtuvieron 3 muestras de yema de diferentes partes del huevo con el fin de captar variaciones en la concentración de hormonas. En un segundo experimento, se analizaron las diferencias hormonales entre nidos provenientes de naturaleza y semicautiverio. Finalmente, en un tercer experimento, se estudió la variabilidad en la concentración hormonal entre los nidos incluidos en el presente trabajo. Para este análisis se consideraron 17 nidos muestreados en las cuatro temporadas de estudio, tomando 3 huevos por nido, con el objetivo de evaluar las posibles diferencias en las concentraciones de hormonas esteroides entre nidos.

1.3.4. Relación entre ácidos grasos y hormonas esteroides en la yema de huevo

Para explorar la relación entre la inversión materna de ácidos grasos y hormonas esteroides en la yema de los huevos de nidos de yacaré con el porcentaje de hembras obtenido por cada nido, se analizaron 42 huevos en total, de 14 nidos (tomando 3 huevos por nido) provenientes de la naturaleza a los que se les determinó el perfil de ácidos grasos y la concentración de hormonas esteroides.

La exclusión de los tres nidos provenientes del semicautiverio (nidos 1, 2 y 5; Anexo I: Tabla 1) se fundamentó en que, durante el análisis exploratorio, se observaron diferencias marcadas en el perfil de ácidos grasos entre nidos de origen natural y nidos de semicautiverio. Estas diferencias responden a la dieta controlada ofrecida en el semicautiverio y generan un patrón lipídico que no es comparable con el de los nidos de naturaleza. La inclusión de estos nidos en el ACP introduce una fuente de variación que enmascaraba los patrones propios de los nidos naturales y condiciona la interpretación de los resultados.

1.3.5. Análisis de datos

Para analizar las diferencias en el perfil de ácidos grasos entre huevos provenientes de la naturaleza y de semicautiverio, se realizó un Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (PERMANOVA) utilizando la matriz de disimilitud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Con el fin

de evaluar las diferencias entre grupos para cada ácido graso en particular, se emplearon modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs) con distribución beta, incluyendo la procedencia como efecto fijo y al nido como variable aleatoria.

En el estudio preliminar del E₂ en la yema, se aplicó un ANOVA jerárquico. En cambio, los datos de T no cumplieron con los supuestos de normalidad, por lo que se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para evaluar las diferencias en los niveles de E₂ y T entre nidos, se realizó un ANOVA, y para comparar entre huevos de naturaleza y semicautiverio se utilizaron GLMMs, nuevamente incluyendo la procedencia como efecto fijo y el nido como efecto aleatorio. Como ambos esteroides cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se utilizaron modelos con distribución gaussiana para su análisis.

Se evaluó la relación entre el porcentaje de hembras obtenido por nido y la concentración de hormonas esteroides maternas en la yema mediante regresiones lineales. De la misma manera, se evaluaron posibles asociaciones entre E₂, T y el porcentaje de hembras con las variables morfométricas de los huevos (peso, largo y ancho) y el tamaño del nido (cantidad de huevos). Además para analizar la relación entre el porcentaje de hembras y la concentración de E₂ en la yema de huevo realizamos un modelo lineal generalizado (GLM) lineal y cuadrático y un modelo aditivo generalizado (MAG) que permite una forma funcional flexible mediante suavizamientos. La selección del modelo se basó en el Criterio de Información de Akaike (AIC), prefiriéndose el modelo con el AIC más bajo. La capacidad predictiva del MAG fue evaluada mediante validación cruzada leave-one-out, calculando el error cuadrático medio de predicción (RMSE). La toma de las medidas morfométricas se encuentra descrita en el Capítulo 1, sección 1.8.1.

Todos los análisis estadísticos mencionados anteriormente fueron realizados en RStudio (versión 4.3.0). El PERMANOVA se ejecutó con el paquete *vegan* (Oksanen et al., 2005). Para los GLMMs con distribución beta se utilizó la función *glmmTMB* del paquete *glmmTMB* (Brooks et al., 2017), y se evaluó el ajuste de la distribución mediante la inspección de residuos simulados con el paquete *DHARMa* (Hartig, 2016). Para los modelos mixtos con distribución gaussiana, se empleó la función *lme* del paquete *nlme* (Pinheiro & Bates, 2023). Se evaluaron las diferencias de los efectos fijos en los GLMMs utilizando pruebas de razón de verosimilitud (Likelihood Ratio Tests, LRT) obtenidas con la función *Anova* del paquete *car* (Fox & Weisberg, 2018). Para GLM se utilizó la función *glm* del paquete *stat* y para el modelo MAG se utilizó la función *gam* del paquete *mgcv* (Wood, 2025). Para realizar los gráficos se utilizó el paquete *ggplot2* (Wickham, 2009).

Para explorar la relación entre los ácidos grasos, las hormonas esteroides y el porcentaje de hembras de las nidadas se realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa Infostat (versión 2020).

1.4. Resultados

1.4.1. Inversión materna de ácidos grasos en yema de huevo

Los ácidos grasos de los nidos de naturaleza y del semicautiverio fueron diferentes ($R^2 = 0,93$; $F = 345,49$; $p = 0,001$), con variaciones en los porcentajes de 14 de los ácidos grasos de los 20 analizados en total (Tabla 4 y Anexo I: Tabla 2). Tanto los nidos de naturaleza como los de semicautiverio se caracterizaron por presentar mayores proporciones de ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1 n-9) y ácido linoleico (18:2 n-6), aunque en proporciones distintas.

En los nidos de naturaleza, el ácido graso predominante fue el 18:1 n-9 ($30,44 \pm 3,16$ %), seguido del 16:0 ($21,22 \pm 0,65$ %) y del 18:2 n-6 ($9,71 \pm 0,51$ %). Por el contrario, en los nidos de semicautiverio, el 18:2 n-6 fue el más abundante ($30,97 \pm 0,96$ %), seguido por el 18:1 n-9 ($30,03 \pm 1,35$) y el 16:0 ($20,93 \pm 0,46$). Además, presentaron un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI; $35,29 \pm 1,88$ %), principalmente de la serie n-6 ($33,78 \pm 1,19$ %), y un menor porcentaje de ácidos grasos n-3 ($2,00 \pm 0,13$ %) en comparación con los nidos de naturaleza. Los nidos de naturaleza presentaron porcentajes más elevados de ácidos grasos esenciales, como el ácido α -linolénico (18:3 n-3; $4,43 \pm 0,35$ %), el ácido araquidónico (20:4 n-6; $4,05 \pm 0,43$ %), el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3; $0,44 \pm 0,21$ %) y el ácido docosahexaenoico (22:6 n-3; $1,74 \pm 0,34$ %), en comparación con los nidos provenientes del semicautiverio.

Del total de ácidos grasos que mostraron diferencias entre naturaleza y semicautiverio, únicamente el 18:2 n-6 presentó el porcentaje más elevado en los nidos de semicautiverio. En cambio, en todos los demás ácidos grasos que difirieron entre ambos orígenes, los porcentajes fueron mayores en los nidos de naturaleza.

Tabla 4: Diferencias en la composición de ácidos grasos (media del % de FAME $\pm$ desvío estándar) de los nidos de naturaleza y de semicautiverio.

Ácidos grasos	Naturaleza	Semicautiverio	Estadístico de prueba (χ^2_1)	Valor p
14:0	0,72 $\pm$ 0,20	0,14 $\pm$ 0,04	93,70	< 0,0001
15:0	0,68 $\pm$ 0,16	0,05 $\pm$ 0,03	174,74	< 0,0001
16:0	21,22 $\pm$ 0,65	20,93 $\pm$ 0,46	1,06	0,3038
16:1 n-9	1,08 $\pm$ 0,55	0,41 $\pm$ 0,11	9,96	0,0016
16:1 n-7	5,36 $\pm$ 0,01	1,92 $\pm$ 0,22	92,06	< 0,0001
17:0	1,46 $\pm$ 0,28	0,21 $\pm$ 0,03	225,49	< 0,0001
18:0	5,70 $\pm$ 0,32	6,02 $\pm$ 0,54	2,04	0,1513
18:1 n-9	30,44 $\pm$ 3,16	30,03 $\pm$ 1,35	0,05	0,8223
18:1 n-7	8,48 $\pm$ 0,45	2,88 $\pm$ 0,87	691,94	< 0,0001
18:2 n-6	9,71 $\pm$ 0,51	30,97 $\pm$ 0,96	3248,90	< 0,0001
18:3 n-3	4,43 $\pm$ 0,35	1,36 $\pm$ 0,11	543,99	< 0,0001
20:0	0,16 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,12	0,56	0,4559
20:1 n-9	0,25 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,03	9,95	0,0016
20:2 n-6	0,26 $\pm$ 0,09	0,24 $\pm$ 0,08	0,15	0,6944
20:3 n-6	0,37 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,07	0,56	0,4524
20:3 n-3	0,25 $\pm$ 0,08	0,06 $\pm$ 0,03	27,63	< 0,0001
20:4 n-6 (AA)	4,05 $\pm$ 0,43	1,96 $\pm$ 0,91	148,31	< 0,0001
20:5 n-3 (EPA)	0,44 $\pm$ 0,21	0,07 $\pm$ 0,02	1,50	< 0,0001
22:5 n-6	0,46 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,03	72,96	< 0,0001
22:6 n-3 (DHA)	1,74 $\pm$ 0,34	0,51 $\pm$ 0,03	139,81	< 0,0001
$\sum AGS^a$	30,08 $\pm$ 0,77	28,60 $\pm$ 1,50	5,68	0,0171
$\sum AGMI^b$	46,44 $\pm$ 2,35	35,95 $\pm$ 1,52	60,78	< 0,0001
$\sum AGPI^c$	21,82 $\pm$ 1,48	35,29 $\pm$ 1,88	179,11	< 0,0001
$\sum AGPI\ n-3^d$	6,49 $\pm$ 1,14	2,00 $\pm$ 0,13	125,59	< 0,0001
$\sum AGPI\ n-6^e$	15,28 $\pm$ 0,49	33,78 $\pm$ 1,19	2118,8	< 0,0001
$\sum n-6/\sum n-3^f$	2.43 $\pm$ 0.50	16.96 $\pm$ 0.89	1245,50	< 0,0001

En negrita se destacan aquellos ácidos grasos en los que se obtuvieron diferencias en cuanto al origen ($p < 0,05$).

AA: ácido araquidónico, AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturado, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, DHA: ácido docosahexaenoico, EPA: ácido eicosapentaenoico.

^a $\sum AGS$: 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0.

^b $\sum AGMI$: 16:1 n-9 + 16:1 n-7 + 18:1 n-9 + 18:1 n-7 + 20:1 n-9.

^c $\sum AGPI$: 18:2 n-6 + 18:3 n-3 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:5 n-6 + 22:6 n-3.

^d $\sum AGPI\ n-3$: 18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3.

$^e\sum AGPI\ n-6$: 18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6.

$^f\sum n-6/\sum n-3$: (18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6)/(18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3).

1.4.2. Inversión materna de hormonas esteroideas en yema de huevo

En cuanto a la inversión materna de E_2 en la yema de huevo de los nidos estudiados, los valores de concentración oscilaron entre $4,28 \pm 0,96$ ng/g y $12,19 \pm 2,56$ ng/g (Fig 15, Anexo I: Tabla 1). Se observaron diferencias en la concentración de E_2 entre nidos ($F_{16,34} = 2,741$; $p = 0,007$), y la concentración de E_2 intranidada ($F_{6,18} = 3,121$; $p = 0,03442$). Sin embargo, las diferencias de E_2 entre los nidos fueron mayores que las diferencias dentro de los nidos ($MS_{intranidada} = 44,86$; $MS_{intranidada} = 16,05$). Además, no se encontraron diferencias entre nidos de naturaleza y semicautiverio en la concentración de E_2 ($F_{1,9} = 1,2689$; $p = 0,2891$).

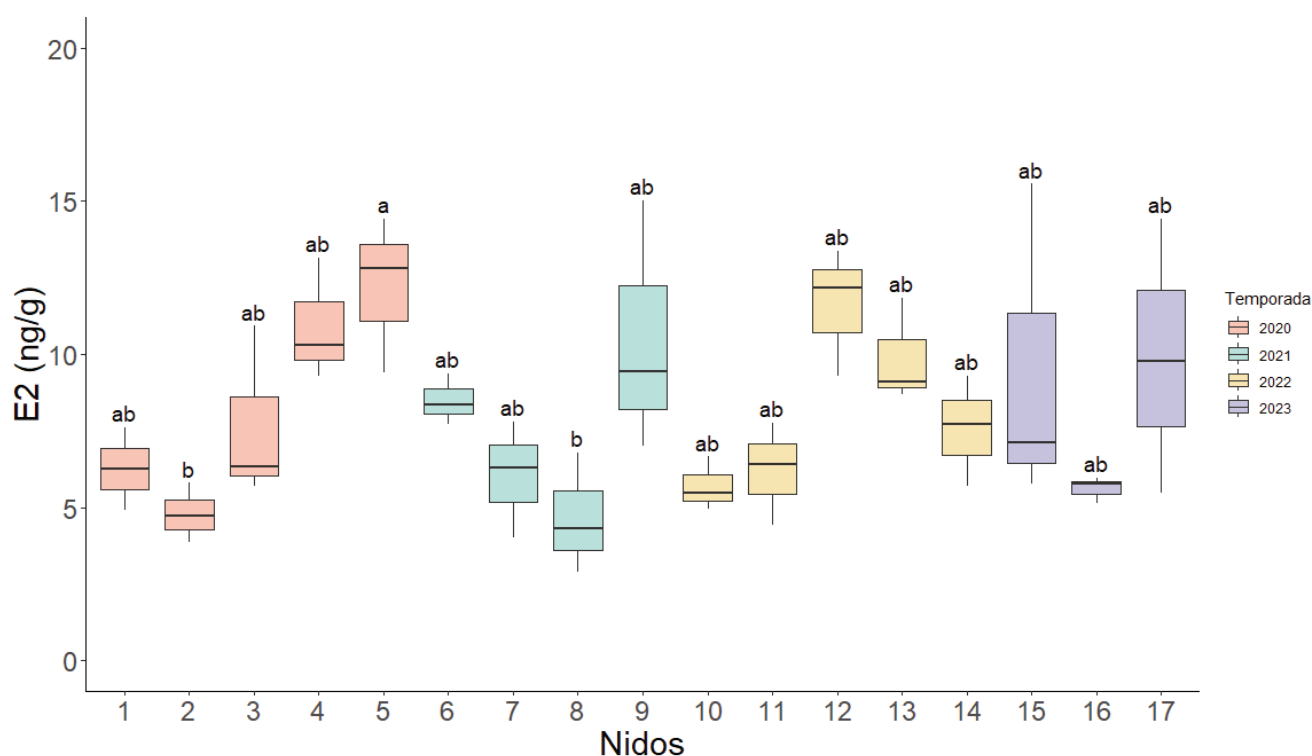


Figura 15: Concentraciones de estradiol (E_2) correspondientes a la inversión materna en nidos de *C. latirostris* recolectados en las cuatro temporadas estudiadas.

Respecto a la concentración relativa de T, no se encontraron diferencias entre nidos en cuanto a la concentración relativa de T ($F_{16,34} = 1,061$; $p = 0,425$), ni dentro de la nidada ($H_8 = 6,71$; $p = 0,5279$). Tampoco se registraron diferencias entre nidos de naturaleza y semicautiverio ($F_{1,9} = 0,0948$; $p = 0,7651$)(Fig. 16).

No se logró detectar androstenediona en la yema de huevo de los nidos estudiados con ninguno de los diferentes métodos de extracción.

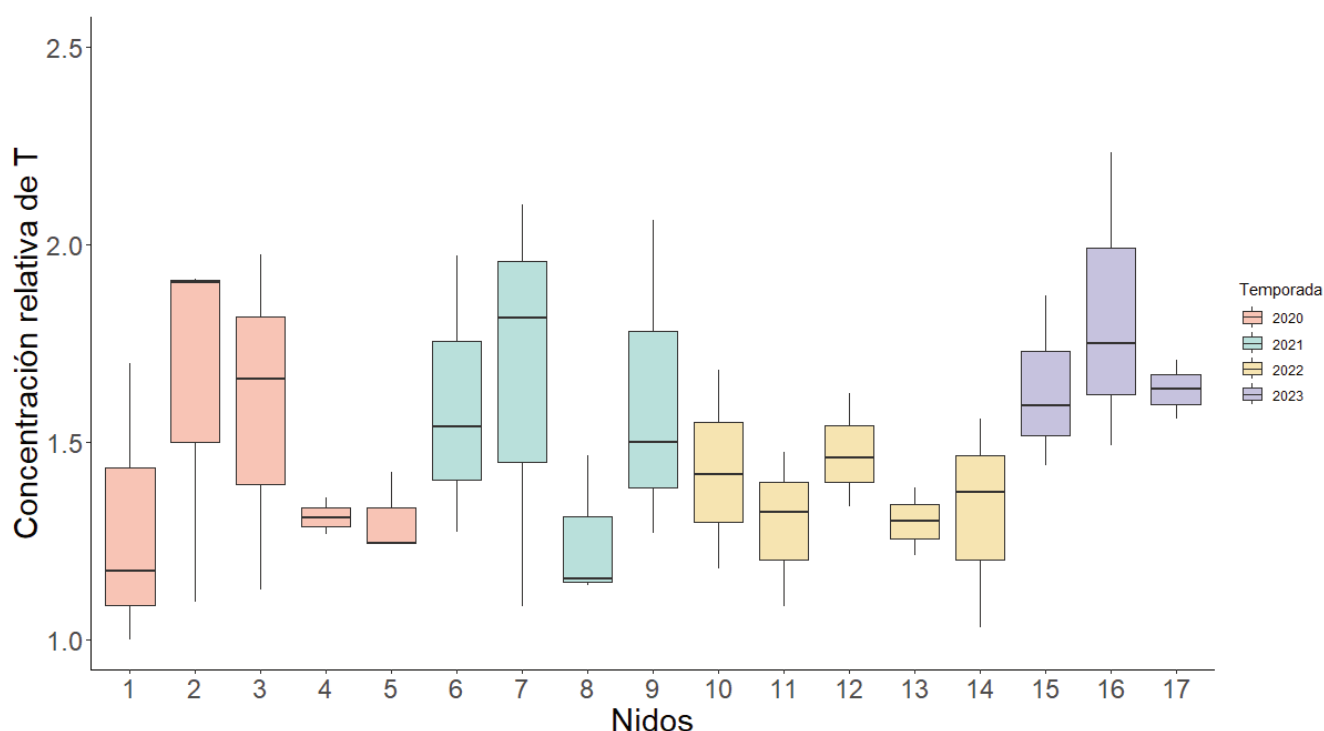


Figura 16: Concentraciones relativas de testosterona (T) correspondientes a la inversión materna en nidos de *Caiman latirostris* recolectados en las cuatro temporadas estudiadas.

1.4.3. Relación entre ácidos grasos, hormonas esteroides y el porcentaje de hembras de los nidos

Debido a los resultados obtenidos anteriormente, se utilizaron sólo nidos de naturaleza con el objetivo de estudiar la relación entre los ácidos grasos y las hormonas esteroides depositadas en la yema de huevo. En el ACP realizado, las dos primeras componentes en conjunto representaron un 67,3% de la variabilidad (Fig. 17). No se encontró ninguna correlación entre los ácidos grasos y las hormonas esteroides evaluadas (E_2 y T). El único ácido graso que se correlacionó negativamente con el porcentaje de hembras de los nidos fue el 16:0 ($p = 0,0394$) (Tabla 5).

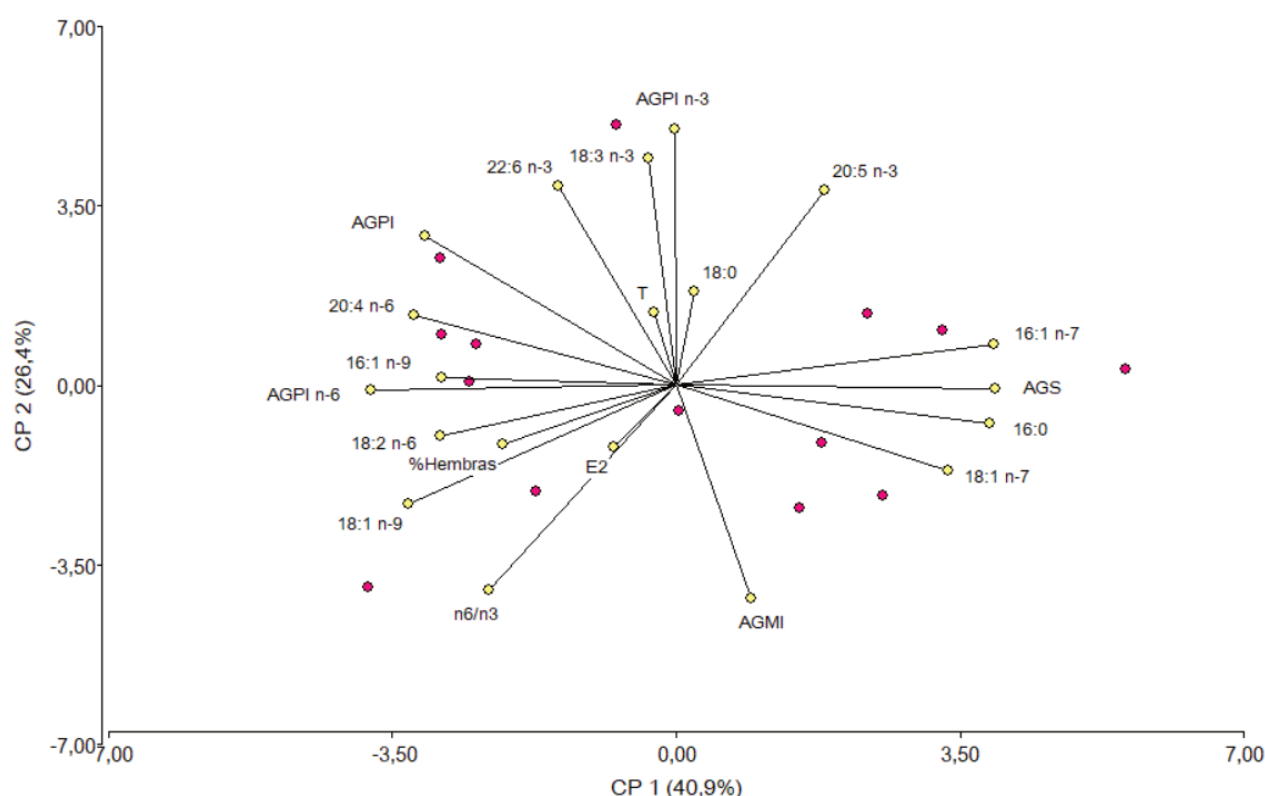


Figura 17: Análisis de componentes principales entre los ácidos grasos, hormonas esteroides (E₂ y T) de la yema de huevo y el porcentaje de hembras de nidos de *Caiman latirostris*. Cada punto rosa representa un nido y fue considerado como unidad de clasificación en el análisis. %Hembras: porcentaje de hembras, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGS: ácidos grasos saturados, E₂: 17β-estradiol, n-6/n-3: relación entre AGPI n-6 y AGPI n-3, T: testosterona.

Tabla 5: Asociaciones entre los ácidos grasos, las hormonas esteroides (E₂ y T) y el porcentaje de hembras en nidos de *Caiman latirostris* con la primera (CP1) y segunda componente principal (CP2).

Variables	CP1	CP 2
E₂	-0,19	-0,24
T	-0,07	0,28
% Hembras	-0,53	-0,23
16:0	0,95	-0,15
16:1 n-9	-0,71	0,03
16:1 n-7	0,96	0,16
18:0	0,06	0,36
18:1 n-9	-0,81	-0,46
18:1 n-7	0,82	-0,33
18:2 n-6	-0,71	-0,20

18:3 n-3	-0,08	0,87
20:4 n-6	-0,79	0,27
20:5 n-3	0,45	0,75
22:6 n-3	-0,36	0,77
AGS	0,97	-0,01
AGMI	0,23	-0,82
AGPI	-0,76	0,57
AGPI n-3	$-4,2 \times 10^{-3}$	0,98
AGPI n-6	-0,92	-0,02
n-6/n-3	-0,53	-0,23

%Hembras: porcentaje de hembras, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGS: ácidos grasos saturados, E₂: 17β-estradiol, n-6/n-3: relación entre AGPI n-6 y AGPI n-3, T: testosterona.

1.4.4. Relación entre las hormonas esteroideas y el porcentaje de hembras de nidos

Para estudiar esta relación se construyó un modelo de regresión lineal múltiple para evaluar el efecto de las concentraciones de E₂ y T en la yema de huevo sobre el porcentaje de hembras obtenidas. Mediante un procedimiento de selección de modelo paso a paso (stepwise), se indentificó que únicamente el E₂ contribuyó a explicar la variabilidad observada. Por lo tanto, se procedió a evaluar la contribución de E₂ y T por separado.

La relación entre el porcentaje de hembras y la concentración de E₂ ajustó a un modelo de regresión polinómica de segundo grado ($y = 186,94 - 43,56x + 3,15x^2$) con $R^2 = 0,4255$ (R^2 ajustado = 0,3434; $F_{2,14} = 5,184$; $p = 0,021$)(Fig. 18 A). Cuando se realizó la comparación entre los GLM lineal y cuadrático y el MAG, este último mostró un ajuste mejor (AIC = 165,2) en comparación con los otros modelos analizados (modelo lineal: AIC = 170,3; modelo cuadrático: AIC = 167,4, Tabla 3). La validación cruzada leave-one-out arrojó errores de predicción (RMSE) de 30.9% para el modelo MAG, indicando capacidad predictiva moderada, lo que es coherente con la complejidad de este tipo de estudios ecológicos, donde múltiples factores no medidos pueden influir en la proporción de sexos.

Por otro lado, la relación entre el porcentaje de hembras y la concentración relativa de T ajustó a una regresión lineal ($y = 188,33 - 89,22x$) con un $R^2 = 0,2136$ (R^2 ajustado = 0,1612; $F_{1,15} = 4,075$; $p = 0,061$)(Fig. 18 B, Anexo I: Tabla 4).

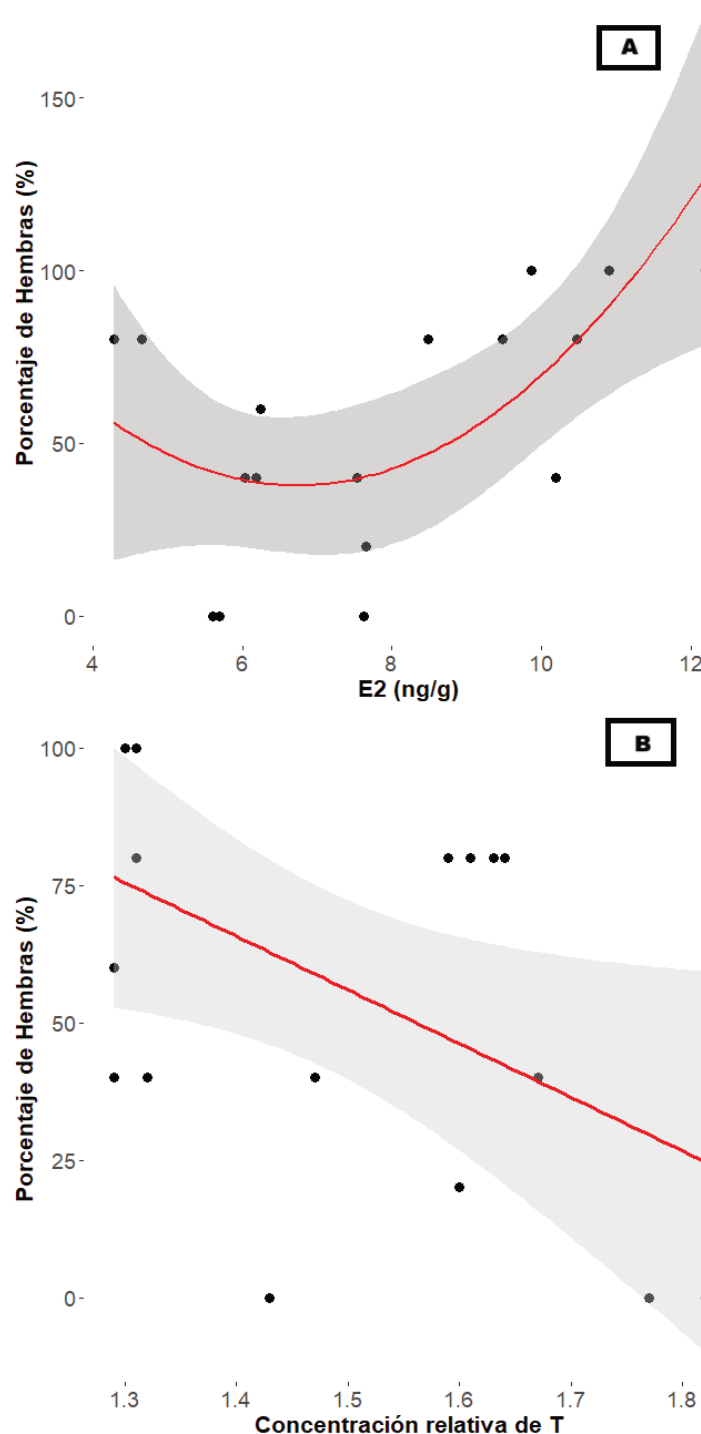


Figura 18: Relación entre el porcentaje de hembras obtenido en cada nido y A) la concentración inicial de estradiol (E₂) y B) testosterona (T) en la yema del huevo. El área sombreada en gris indica el intervalo de confianza del 95%.

También se evaluó la relación entre el porcentaje de hembras con la cantidad total de E₂, que también ajustó a una regresión polinómica de segundo grado ($y = 103,99 - 0,74x + 0,002x^2$) con un $R^2 = 0,25$ (R^2 ajustado = 0,14; $F_{2,14} = 2,29$; $p = 0,1375$).

1.4.5. Asociación entre niveles hormonales, proporción de hembras y tamaño de postura de los nidos con la morfometría del huevo

No se encontró relación entre E₂, T, el porcentaje de hembras con el tamaño del nido (cantidad de huevos) ni con las variables morfométricas de los huevos ($p > 0,05$)(Anexo I: Tablas 5 y 6).

1.5. Discusión

1.5.1. Inversión materna de ácidos grasos en naturaleza y semicautiverio

Estudios previos describieron el perfil de ácidos grasos de la yema de huevo del yacaré overo y su relación con los atributos maternos (Leiva et al., 2018b; Leiva, 2019). Sin embargo, no hay investigaciones que relacionen la inversión de ácidos grasos con el sexo de las crías. En el presente estudio, se realizó previamente una caracterización de los nidos en condiciones de semicautiverio. Si bien existen antecedentes en *Alligator mississippiensis* que indican que el perfil de ácidos grasos en la yema de los huevos provenientes de nidos en cautiverio difiere del observado en nidos en estado natural (Noble et al., 1993b), las condiciones de semicautiverio presentan particularidades intermedias. Aunque existe cierta intervención humana, los animales disponen de un espacio más amplio y de condiciones ambientales que imitan su hábitat natural. A pesar de que el entorno está delimitado por barreras físicas, se asemeja en gran medida al medio natural, lo que podría minimizar las diferencias en el perfil de ácidos grasos en comparación con animales completamente en cautiverio. Si bien, en estas condiciones los animales son alimentados por humanos, tienen acceso a otros recursos ya que dentro de su hábitat (a cielo abierto) conviven con tortugas, e incluso aves e insectos que visitan el lugar.

En naturaleza, los ácidos grasos más abundantes fueron el 18:1 n-9 (30,44%), 16:0 (21,22%) y 18:2 n-6 (9,71%), lo que concuerda con los resultados informados por Leiva et al. (2018b). En semicautiverio el ácido graso más abundante fue el 18:2 n-6 (30,97%), seguido por el 18:1 n-9 (30,03%) y el 16:0 (20,93%). Noble et al. (1993b) reportaron que en cautiverio los animales poseían mayor porcentaje de 18:1 n-9 (25,70 – 33,90%) y 16:0 (24,70 – 26,30%), seguido por 18:2 n-6 (18,90 – 19,40%), siendo más bajos los valores de 18:2 n-6 en comparación con los resultados obtenidos en este estudio. Al igual que Noble et al. (1993b), se encontró una reducción de la proporción de AGPI de la serie n-3, con un aumento de los ácidos grasos de los AGPI n-6 que se debe principalmente al incremento del 18:2 n-6.

Las principales diferencias entre los animales de semicautiverio del presente estudio y los animales de cautiverio de Noble et al. (1993b) se deben a la dieta ofrecida. La dieta elaborada para los animales en semicautiverio en este estudio se basa en carne de pollo molida con alimento balanceado para reptiles (Simoncini et al., 2020) que contiene un mayor porcentaje de 18:2 n-6 en comparación con las dietas comerciales presentadas en el trabajo de Noble et al. (1993b) (Tabla 6). Esto podría

explicar el mayor contenido de 18:2 n-6 observado en la yema de los huevos analizados en este estudio. Dependiendo de la disponibilidad de recursos y de los mecanismos de transferencia materna, las hembras podrían priorizar la movilización de ácidos grasos esenciales, como el 18:2 n-6, hacia la yema durante la vitelogénesis, con el objetivo de cubrir las demandas nutricionales necesarias para el adecuado desarrollo embrionario. Por lo tanto, el alimento ofrecido en semicautiverio es el que se ve reflejado en el perfil de ácidos grasos de la yema de huevo, lo que sugiere que los recursos que las hembras podrían obtener por su cuenta son escasos en comparación con la dieta suministrada, y por ello no influyen en la composición de ácidos grasos de la yema.

Tabla 6: Composición de ácidos grasos de las dietas suministradas en el semicautiverio en el presente estudio (donde se le suministró a los animales la dieta descrita por Simoncini et al., 2020) y del cautiverio en *Alligator mississippiensis* (Noble et al., 1993b).

Ácidos grasos	Dieta semicautiverio (Simoncini et al., 2020)	Dieta cautiverio (Noble et al. 1993b)
16:0	22,37	23,90
16:1 n-7	5,91	8,33
18:0	5,53	10,90
18:1 n-9	36,55	26,20
18:2 n-6	24,67	9,24
18:3 n-3	2,33	3,31
20:4 n-6	0,48	1,48
20:5 n-3	-	5,42
22:6 n-3	0,07	2,16

1.5.2. Inversión materna de hormonas esteroides en yema de huevo

En lo que respecta a la inversión materna de hormonas esteroides en la yema de huevo, este constituye el primer estudio que las analiza en *Caiman latirostris*. Si bien existen reportes de su concentración en otras especies de cocodrilianos como *Alligator mississippiensis*, son a partir del estadio 16 de desarrollo, donde el embrión se encuentra en una etapa más avanzada de desarrollo (Conley et al., 1997). En los nidos analizados en este estudio se encontraron concentraciones entre $4,28 \pm 0,96$ ng/g y $12,19 \pm 2,56$ ng/g de E₂, con diferencias entre huevos del mismo nido y entre nidos, aunque las diferencias entre los nidos fueron mayores. Para T, si bien se informaron concentraciones relativas, no se observaron diferencias entre huevos del mismo nido y entre nidos. Estos resultados coinciden con los reportados por Conley et al. (1997), quienes observaron diferencias de hasta tres veces en las concentraciones de E₂ entre distintos nidos, mientras que no encontraron variaciones en los niveles de T.

Si bien en reptiles se ha encontrado que la alimentación, el ayuno o restricciones alimentarias influyen sobre la esteroidogénesis (Carsia et al., 2012; Himmelstein et al., 2021) y en la deposición de hormonas en la yema de huevo (Rutstein et al., 2005), en este estudio no se encontraron diferencias en la inversión de estas hormonas entre hembras provenientes de la naturaleza y del semicautiverio. Los resultados obtenidos sugieren que la inversión de E_2 y T, a diferencia de lo que sucede con los ácidos grasos, no estaría afectada por el tipo de alimentación de las hembras si no que podría tener que ver con atributos propios o incluso con condiciones ambientales. Como se mencionó anteriormente (Introducción), se desconoce cuál es la fuente de hormonas esteroides que se deposita en la yema por parte de la hembra. Se cree que es un proceso que estaría regulado por mecanismos fisiológicos propios de la hembra o por una producción local de esteroides (por parte de células de la granulosa y de la teca) (Moore & Johnston, 2008), siendo consistente con la idea de que las diferencias en la dieta no serían un factor determinante en la deposición de E_2 y T en la yema de huevo. Si bien hablamos de diferentes dietas, no puede descartarse que la restricción alimentaria, como la que podría ocurrir durante sequías extremas con escasez de recursos, pueda influir sobre la inversión materno-hormonal. Un aspecto a considerar es que la reproducción podría estar restringida a hembras con mejor condición corporal (indicador de reservas energéticas) y fisiológica, capaces de mantener una inversión materna óptima aun bajo condiciones ambientales desfavorables, por lo que sólo las hembras más aptas podrían ser las que alcanzarían los niveles hormonales necesarios para una reproducción exitosa. Esto se fundamenta en que en cocodrilianos, las hembras reproductivas tienen una condición corporal mayor en comparación con hembras no reproductoras (Brandt et al., 2016; Viotto et al., 2018).

No se detectó androstenediona en yema mediante electroquimioluminiscencia, a pesar de haber cuantificado E_2 y T. Esto resulta contradictorio teniendo en cuenta que para *Alligator mississippiensis* fue la hormona más abundante presente en la yema de huevo previo al PTS (Conley et al., 1997). Dado el alto contenido lipídico de la matriz, podría ser probable la presencia de efectos de matriz y/o una recuperación insuficiente de la hormona. Esto podría requerir un paso extra de cromatografía para purificar el extracto y realizar ensayos de recuperación añadiendo un patrón de concentración conocida. Estas consideraciones metodológicas podrían explicar la discrepancia con reportes previos de Conley et al. (1997).

1.5.3. Relación entre la inversión de ácidos grasos y hormonas esteroides con la proporción sexual de los nidos

No se encontró relación entre ningún ácido graso con las concentraciones de E_2 y T depositadas en las yemas de los huevos de los nidos de *Caiman latirostris* de naturaleza. Por lo que no habría una relación entre la inversión de ácidos grasos y hormonas esteroides en la yema de huevo. Esto puede deberse a los diferentes mecanismos por los cuales se depositan los ácidos grasos y las hormonas

esteroides en la yema de huevo. Los ácidos grasos son depositados en los huevos a partir de las VLDL y la vitelogenina (Speake & Thompson, 1999); sin embargo, como se mencionó anteriormente, se desconoce cuál es el mecanismo de deposición de hormonas esteroides en la yema de huevo en las especies ovíparas y se cree que puede ser especie específico (Moore & Johnston, 2008).

En cuanto a la relación entre el porcentaje de hembras y el perfil de ácidos grasos, aquellos nidos que tuvieron un menor porcentaje de hembras se caracterizaron por tener un mayor contenido de 16:0, lo que podría deberse a condiciones ambientales. Estudios sobre la alimentación del yacaré overo en Argentina, mostraron que independientemente de la clase de tamaño de los animales, estos suelen alimentarse principalmente de insectos, moluscos y crustáceos de agua dulce y en menor medida de otros reptiles, peces y aves (Pierini et al., 2025). Es posible que condiciones ambientales extremas, como las asociadas al fenómeno de La Niña (escases de lluvias y sequía), afecten la disponibilidad de presas y sean más abundantes aquellas que contienen mayor cantidad de 16:0. Dentro de los insectos más consumidos por el yacaré overo se encuentran los del orden Coleoptera, Orthoptera, Odonata y Hemiptera, que son fuentes ricas del 16:0 (Goldson et al., 1981; Pradesh, 2011; Escamilla-Rosales et al., 2019; Maneechan & Prommi, 2021). Simoncini et al. (2014) documentaron que en años con eventos de La Niña en los que se produjeron condiciones extremas de sequía, se redujo el porcentaje de hembras en los nidos en la naturaleza. Esto podría explicar la asociación observada entre mayor contenido de 16:0 y menor proporción de hembras, especialmente si esas condiciones coinciden con temperaturas o condiciones ambientales de incubación que favorecen la producción de machos.

Respecto a la relación entre las hormonas esteroides y el porcentaje de hembras en los nidos, el E_2 es la hormona con mayor influencia en la determinación sexual, ya que no se encontró relación entre la T y el porcentaje de hembras de los nidos. Los nidos con concentraciones altas y bajas de E_2 en yema generaron nidos con mayor porcentaje de hembras que aquellos nidos con concentraciones intermedias. Estos resultados concuerdan con lo reportado en estudios previos en especies con DST, los cuales han demostrado que el E_2 , en concentraciones no fisiológicas, tiene una mayor capacidad para inducir la reversión sexual hacia hembras a temperaturas que normalmente producen machos. La administración tópica de T no induce la reversión hacia machos, sino que, por el contrario, favorece la feminización de la descendencia a temperaturas intermedias donde se producen crías de ambos sexos en reptiles con DST. Esto se debe a que la T actúa como sustrato de la aromatasa para la síntesis de E_2 (Crews et al., 1991; Wibbels et al., 1991; Crain et al., 1997; Stoker et al., 2003; Wibbels & Crews, 1995).

¿Pero a qué podría deberse que bajas concentraciones de E_2 generen porcentajes de hembras similares a aquellos nidos con una mayor concentración de E_2 en la yema de huevo? Este fenómeno podría explicarse a través de mecanismos relacionados tanto con la regulación de la enzima aromatasa (*cyp19a1*) como con la presencia y regulación de receptores de estrógenos (RE). Algunos autores han

planteado la hipótesis de que diferentes equilibrios de estrógenos en el cerebro y las gónadas podrían influir en que el desarrollo gonadal siga su curso hacia la diferenciación masculina o femenina (Bogart, 1987; Jeyasuria & Place, 1998). Sin embargo, Pieau & Dorizzi (2004) sostienen que las gónadas son el único órgano implicado en la determinación sexual, ya que responden directamente a los cambios de temperatura y constituyen el sitio de actividad de la aromatasa y de síntesis de estrógenos, procesos que conducen a la diferenciación sexual. Por otro lado, estudios sobre la actividad de la aromatasa en el complejo gónada-adrenal-mesonéfricos (GAM) en cocodrilianos no mostraron cambios durante el periodo termosensible (PTS), si no que el aumento en la actividad de la enzima ocurrió al final del PTS cuando la gónada ya estaba diferenciada (Smith & Josh, 1994a; Milnes et al., 2002). Aún así, la gónada indiferenciada es capaz de unir E_2 tanto a temperaturas productoras de machos como de hembras durante el PTS, específicamente durante el período de diferenciación gonadal (Smith & Josh, 1994b). Se sabe que el E_2 actúa a través de los RE, regulando positivamente la expresión de genes que inducen la diferenciación ovárica, entre ellos el de la aromatasa (*cyp19a1*) (Kohn et al., 2015; Wang et al., 2025). En *Alligator mississippiensis* la reversión sexual mediada por estrógenos está modulada por ESR1 (receptor de estrógenos α) (Doheny et al., 2016). Estudios han respaldado que las diferentes concentraciones de E_2 tienen efectos únicos sobre los RE y su unión al ADN (Han et al., 2025). Por lo tanto, es posible que tanto concentraciones bajas como elevadas de E_2 en la yema activen mecanismos diferenciales sobre la aromatasa o los RE, generando respuestas similares en la proporción de hembras observada.

Capítulo 2: Impacto de las condiciones climáticas en la inversión de hormonas esteroides y ácidos grasos en la yema de huevo en *Caiman latirostris* y su efecto sobre la determinación sexual

2.1. Introducción

Las variables climáticas tienen una influencia significativa sobre la ecología de las poblaciones animales (Stenseth & Mysterud, 2002; Hallett et al., 2004; White, 2008; Selwood et al., 2015; Malhi et al., 2022). El cambio climático está provocando transformaciones tanto en los ecosistemas terrestres como marinos, afectando la distribución y dinámica de las poblaciones animales, la integridad e interacciones dentro de los ecosistemas, modificando las cadenas tróficas y contribuyendo a la pérdida de biodiversidad (Warren et al., 2021; Al Bayati, 2024; Alshehab, 2024). Para los reptiles, los efectos del cambio climático representan una amenaza ya que estos animales, como ectotermos, son especialmente sensibles a las variaciones de las temperaturas ambientales, de las cuales dependen numerosos procesos biológicos. Para las especies ovíparas los cambios en la temperatura pueden afectar tanto la viabilidad de los huevos, así como la proporción de hembras y machos producidos en aquellas especies que presentan determinación sexual por temperatura (DST) (Milnes & Moore, 2024).

Entre los grupos más afectados por estos cambios se encuentran los depredadores ápice, como los cocodrilianos. En estas especies, el aumento de las temperaturas puede impactar en diversas funciones fisiológicas, modificar comportamientos, reducir la disponibilidad de hábitat, alterar los patrones reproductivos e incluso sesgar la proporción de sexos en las nidadas (Munns et al., 1998; Campbell et al., 2010; Simoncini et al., 2011; Bock et al., 2020; Cherkiss et al., 2020; Leiva et al., 2023).

En *Alligator mississippiensis*, durante el otoño y posterior a la cópula (aproximadamente ocho meses antes de la ovulación, que ocurre en primavera/verano) se registra un aumento en los niveles plasmáticos de estradiol (E_2) en las hembras. Este período, denominado posnupcial, marca el inicio del reclutamiento folicular, es decir, la selección y el desarrollo inicial de los folículos ováricos (Guillette et al., 1997). Esta estrategia permitiría a las hembras reproductivas contar con folículos parcialmente desarrollados al comenzar la primavera, listos para reanudar su maduración, y que además podrían actuar como fuente inmediata de E_2 tras la inactividad ovárica del invierno. Sin embargo, los procesos endocrinos pueden verse alterados por condiciones ambientales estresantes, como las temperaturas extremas (tanto altas como bajas). En animales, el estrés térmico es uno de los factores que más impacta sobre las funciones endocrinas, interfiriendo directamente en procesos clave como la reproducción (Arneth, 2025). Además, el calor extremo puede potenciar los efectos de disruptores endocrinos presentes en el ambiente, provocando alteraciones hormonales en las especies expuestas (Boggs et al., 2011). En el caso de especies ovíparas con DST, como ocurre en muchos

reptiles, estos cambios podrían tener implicancias sobre la deposición materna de hormonas esteroides en la yema de huevo, afectando potencialmente el desarrollo embrionario (Lockley & Eizaguirre, 2021). Por lo tanto, resulta relevante estudiar si las condiciones climáticas previas a la oviposición modifican la inversión materna de hormonas esteroides en el huevo, dado su impacto sobre la determinación sexual.

Además, los eventos climáticos extremos pueden alterar la disponibilidad y composición de presas, afectando indirectamente la composición de ácidos grasos en la yema de los huevos (Fuiman, 2018). No sólo se puede ver afectada la disponibilidad de presas, sino que también, el cambio climático impactaría en la calidad nutricional de las presas disponibles, especialmente en lo que respecta a la provisión de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), como los n-3 que son esenciales para el desarrollo embrionario, los cuales provienen principalmente de productores primarios como el fitoplancton (Tan et al., 2022).

Se ha demostrado, que las condiciones climáticas tienen influencia sobre la reproducción y la inversión materna del yacaré overo. Leiva et al. (2023) observaron que tanto las precipitaciones como las temperaturas tienen un efecto significativo sobre la reproducción de *Caiman latirostris* ya que afecta la condición fisiológica de las hembras y su desempeño reproductivo. A su vez, diversos estudios han demostrado que las condiciones climáticas afectan la proporción sexual de los nidos en estado natural, así como en la cantidad de nidos registrados (Simoncini et al., 2011; Simoncini et al., 2014). En particular, Simoncini et al. (2014) registraron que las proporciones sexuales varían entre temporadas, con una disminución en el porcentaje de hembras posterior a eventos climáticos extremos de sequía, como los fenómenos de “La Niña”. Por su parte, Leiva (2019) señala que los ácidos grasos presentes en la yema del huevo de *C. latirostris* son indicadores de atributos maternos vinculados a las reservas energéticas de la hembra, influenciadas por los alimentos consumidos en los meses previos a la oviposición, así como por su genética y metabolismo lipídico. Además, el perfil de ácidos grasos de la yema presenta mayor similitud con el perfil de ácidos grasos del músculo materno que con el del plasma, sugiriendo ser un reflejo de la alimentación previa a la puesta.

En este capítulo se analiza el efecto de las variables climáticas y fenómenos climáticos sobre los ácidos grasos y hormonas esteroides (E_2 y T) depositadas en la yema de los huevos de *Caiman latirostris*. Esto permitiría comprender cómo las condiciones climáticas afectan los componentes de la yema y como esto influye sobre la determinación sexual.

2.2. Objetivos

- Analizar la variación en la inversión de hormonas esteroides y ácidos grasos en la yema de huevo de *Caiman latirostris* durante las diferentes temporadas de estudio.
- Evaluar si existen diferencias en el porcentaje de hembras obtenidas en los nidos entre las distintas temporadas de estudio.

- Determinar la influencia de las condiciones climáticas previas a la oviposición (temperaturas medias y precipitaciones acumuladas) sobre la inversión materno-hormonal y energética (ácidos grasos) en la yema de huevo.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Obtención de nidos

La recolección de nidos se detalla materiales y métodos del Capítulo 1 en la sección 1.3.1. Durante la temporada 2020 se colectaron 6 nidos: 2 en Los Amores (Departamento Vera), 1 en El Cacique (Cacique Ariacaiquín, Departamento San Javier) y 3 provenientes del semicautiverio que se encuentra en el Centro de Rescate, Interpretación e Investigación de Fauna La Esmeralda (CRIIF; Santa Fe, departamento La Capital). En 2021 se recolectaron 5 nidos: 2 en Los Amores, 2 en la reserva natural El Fisco (Santurce, Departamento San Cristóbal) y 1 del semicautiverio en CRIIF. En 2022 se obtuvieron 5 nidos, todos provenientes de la reserva natural El Fisco, y en 2023 se colectaron 3 nidos también todos de la reserva natural El Fisco y 2 nidos del semicautiverio en el CRIIF. Es de destacar, que de estos dos últimos nidos sólo tenemos información del porcentaje de hembras (Fig. 19).



Figura 19: Localidades del centro-norte de la provincia de Santa Fe donde se colectaron los nidos de *Caiman latirostris* durante las diferentes temporadas reproductivas.

2.3.2. Caracterización climática de las temporadas de estudio

Para analizar el efecto ambiental sobre los componentes de la yema de huevo y la determinación sexual de crías de *Caiman latirostris*, se caracterizaron las cuatro temporadas utilizando la clasificación El Niño/Oscilación del Sur (ENOS) y el índice de severidad de sequía de Palmer (PDSI). En el capítulo 1, en la sección 1.6, se encuentra explicado el fenómeno climático ENOS y se detalla el índice bimensual multivariado ENOS (MEI v2) para caracterizar a nivel macroclimático la situación de las cuatro temporadas de estudio colectando los datos a través de <https://psl.noaa.gov/enso/mei/>. En cuanto al PDSI (Palmer, 1965), se trata de un índice cuantitativo ampliamente utilizado para describir el contexto climático local o regional, y fue desarrollado con el objetivo de estimar la "deficiencia de humedad" en una región. Para su cálculo se consideran variables como la evapotranspiración potencial, las precipitaciones mensuales y el contenido de agua en el suelo (<https://www.crean.unc.edu.ar/pdsi-2018-10/>) (Fig. 20). Se utilizaron los datos del PDSI correspondientes al norte y centro de la provincia de Santa Fe, ya que a los nidos de yacaré los recolectamos la localidad de Los Amores (norte), y en las reservas naturales El Fisco y Cacique Ariacaiquín (centro). Esto permitió caracterizar regionalmente las condiciones climáticas de las áreas de estudio. Los datos se obtuvieron a través de Climate Engine (<https://www.climateengine.org/>), utilizando la base de datos TerraClimate.

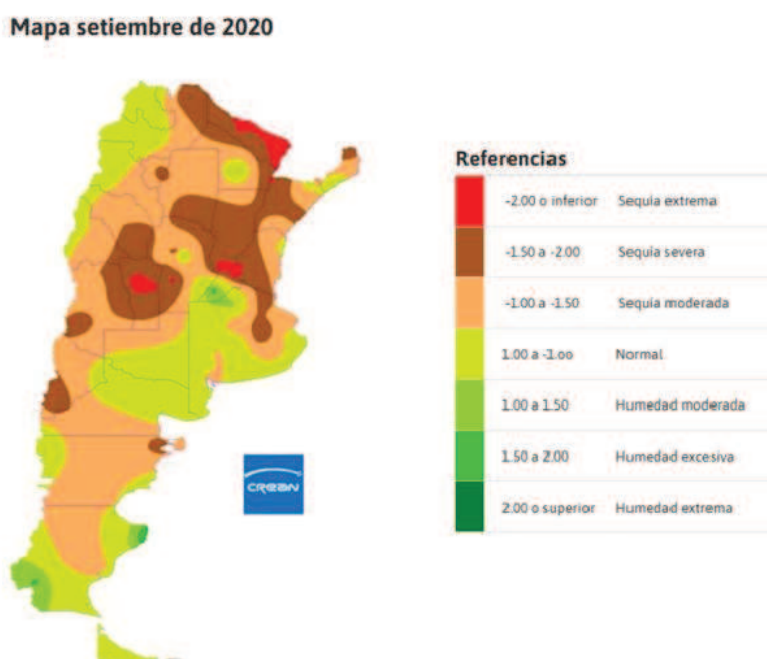


Figura 20: Mapa del Índice de Severidad de Sequía de Palmer (PDSI) mensual del año 2020 en Argentina y las referencias de los índices y su clasificación. Dicho mapa PDSI corresponde al mes de septiembre del año 2020 en Argentina, junto con la referencia de los valores del índice y su clasificación. Si bien el PDSI suele

variar entre -10 (condiciones extremadamente secas) y +10 (condiciones extremadamente húmedas), en este caso se emplea una escala comprendida entre -2 y +2. Fuente: <https://www.crean.unc.edu.ar/pdsi-2020-1/>.

2.3.3. Perfil de ácidos grasos en la yema de huevo de nidos de las diferentes temporadas

La metodología utilizada para determinar los ácidos grasos de la yema del huevo fue la descrita en el Capítulo 1, sección 1.3.3.1. Para estudiar los ácidos grasos de la yema de huevo de las diferentes temporadas reproductivas se utilizaron sólo los nidos de naturaleza: 3 nidos de la temporada 2020, 4 nidos de la temporada 2021, 5 nidos de la temporada 2022 y 3 nidos de la temporada 2023. De los nidos de la temporada 2020 se analizaron los perfiles de ácidos grasos de 2 huevos y de las restantes temporadas determinamos ácidos grasos para 3 huevos por nido.

2.3.4. Concentración de hormonas esteroides en la yema de huevo de nidos de las diferentes temporadas

La metodología utilizada para determinar E₂ y T fue la descrita en el Capítulo 1, sección 1.3.3.2. Como en el capítulo 1 no se encontraron diferencias entre nidos de naturaleza y semicautiverio, se decidió incorporar tanto nidos de naturaleza como de semicautiverio para evaluar diferencias entre temporadas en cuanto a la inversión materna de hormonas esteroides. Se utilizaron 4 nidos de la temporada 2020 (debido a que de uno de los nidos no se pudieron determinar las hormonas esteroides), los 5 nidos de la temporada 2021, los 5 nidos cosechados de la temporada 2022 y los 3 nidos cosechados en la temporada 2023. Se determinó la concentración de hormonas esteroides en la yema de 3 huevos de cada nido.

2.3.5. Determinación del sexo de los animales en las diferentes temporadas

Se utilizaron todos los nidos recolectados durante las cuatro temporadas de estudio: 6 nidos de la temporada 2020, 5 de la temporada 2021, 5 de la temporada 2022 y 5 en la temporada 2023. Tras la eclosión de los nidos incubados a una temperatura constante de 32 °C, se determinó el sexo de cinco individuos por nido. La metodología empleada para el sexado de los animales fue descrita en el Capítulo 1, sección 1.3.2.

2.3.6. Variables climáticas

Se utilizaron las variables climáticas (precipitaciones acumuladas y temperaturas medias) correspondientes a los meses previos a la oviposición, específicas para cada sitio y año en que se realizó la recolección de los nidos. En particular, se obtuvieron datos climáticos de los meses de marzo y abril, así como de septiembre, octubre y noviembre, previos a la puesta. La elección de estos períodos se fundamenta en aspectos fisiológicos y ecológicos de *Caiman latirostris*. Durante marzo y abril, con la llegada del otoño en el hemisferio sur, las temperaturas comienzan a descender y los

yacarés incrementan su ingesta alimentaria para almacenar energía, la cual será utilizada durante el período de aletargamiento y también como reserva para la siguiente temporada reproductiva (Lance, 2003; Price, 2017; Leiva, 2019). Por otro lado, se incluyeron también los datos de los meses previos a la oviposición (septiembre, octubre y noviembre), ya que en este período tiene lugar la vitelogénesis, proceso que puede verse influido por las condiciones climáticas, afectando tanto el perfil lipídico como hormonal en sangre de las hembras (Portelinha et al., 2015) (Fig 21).

Para analizar la relación entre las variables climáticas y la inversión energética y hormonal materna, se utilizaron únicamente los nidos provenientes de hembras de la naturaleza. Esto se debe a que, además del posible estrés térmico, estas hembras podrían haber experimentado períodos de restricción alimentaria, lo cual podría haber influido en su inversión materna.

Los datos de precipitaciones acumuladas y temperatura media de los sitios en los meses propuestos se obtuvieron a través de Climate Engine (<https://www.climateengine.org/>), utilizando la base de datos CFSRanalysis.



Figura 21: Diagrama del procedimiento de muestreo y registro de las variables climáticas a lo largo del ciclo reproductivo de *Caiman latirostris*

2.3.7. Análisis de datos

Se realizó un Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (PERMANOVA) entre las temporadas, y además un análisis por pares con el fin de evaluar las diferencias entre ellas. Los análisis fueron realizados con el software Rstudio (versión 4.3.0) mediante el paquete vegan (Oksanen et al., 2005) y se utilizó la matriz de disimilud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Para identificar

los ácidos grasos asociados a cada temporada, se realizó un análisis de patrones multinivel utilizando la función `multipatt` del paquete `indicspecies` (Cáceres & Legendre, 2009), con 9999 permutaciones y el coeficiente de correlación punto-biserial (r_g) como medida de asociación. Como no se encontraron antecedentes de un análisis de patrones multinivel para ácidos grasos, se decidió respaldarlo mediante un GLMM con distribución beta (Anexo II: Tablas 7 y 8) donde se evaluaron diferencias en los ácidos grasos con la temporada como efecto fijo y utilizando como variables aleatorias a los nidos. También se empleó un análisis no métrico multidimensional (NMDS) en tres dimensiones para representar gráficamente los resultados del PERMANOVA. El NMDS es una técnica de ordenación multivariada que utiliza una matriz de disimilitud (en este caso, Bray-Curtis) para ubicar cada muestra en un espacio de pocas dimensiones, de manera que las distancias entre puntos reflejen las diferencias entre grupos. Para realizar el gráfico del NMDS se utilizaron los paquetes `vegan` (Oksanen et al., 2005), `plotly` (Sievert, 2020) y `dplyr` (Wickham, 2015) y para los GLMMs se utilizó la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` con el software Rstudio (versión 4.3.0).

Para analizar las diferencias en los niveles de E_2 entre temporadas y dentro de las temporadas, también se utilizaron GLMMs. Previamente, se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y de Bartlett, respectivamente. Tanto E_2 como T no cumplieron con los supuestos de normalidad ni homogeneidad de varianzas, por lo que se optó por utilizar una distribución Gamma para el modelado. Para evaluar el ajuste de la distribución al conjunto de datos, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Aquí también se utilizó la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` (Brooks et al., 2017). Se evaluaron las diferencias de los efectos fijos en los GLMMs utilizando pruebas de razón de verosimilitud (Likelihood Ratio Tests, LRT) obtenidas con la función `Anova` del paquete `car` (Fox & Weisberg, 2018).

En cuanto al porcentaje de hembras producidas en las diferentes temporadas, se analizó mediante un ANOVA, con la previa verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para las comparaciones múltiples se empleó el test post-hoc LSD de Fisher.

Para explorar la relación entre las variables climáticas con los ácidos grasos, hormonas esteroides y el porcentaje de hembras de los nidos se realizaron los análisis de componentes principales (ACP) utilizando el software Infostat (versión 2020).

2.4. Resultados

2.4.1. Caracterización climática de las temporadas de estudio

Con respecto al fenómeno ENOS, la introducción general (Tabla 2) se presentaron los valores de los índices multivariados bimensuales correspondientes a las cuatro temporadas estudiadas (2020 - 2023), donde predominó la influencia de La Niña. La primera temporada (2020) se caracterizó por comenzar en fase Neutra, seguida de una transición hacia La Niña débil a moderada a partir de

mediados de año. En 2021, el año comenzó bajo condiciones de La Niña moderada, que evolucionó hacia La Niña fuerte en la segunda mitad del año. Durante 2022, la influencia de La Niña fuerte se mantuvo de manera sostenida durante todo el año. Finalmente, el 2023 inició con La Niña moderada, pero a partir de mediados de año comenzó una transición hacia la fase Neutra, y hacia fines del año comenzó el ingreso a una fase El Niño.

En cuanto al PDSI, tanto en la zona norte como la zona centro de la provincia de Santa Fe, la temporada 2020 fue la que presentó condiciones menos secas con respecto a las otras temporadas. Sin embargo, en la temporada 2021, en la zona norte la sequía continuó acentuándose, lo que se reflejó en un PDSI más negativo respecto a la temporada 2020, pero a partir de mayo comenzaron las lluvias progresivamente, finalizando el año con condiciones menos secas con respecto a los primeros meses. Por el contrario, la zona centro se caracterizó por condiciones más secas que la zona norte durante casi todo el año 2021. Finalmente, las temporadas 2022 y 2023 se caracterizaron por presentar sequías extremas en ambas zonas (centro y norte), con valores de PDSI muy negativos durante ambos años (Fig. 22).

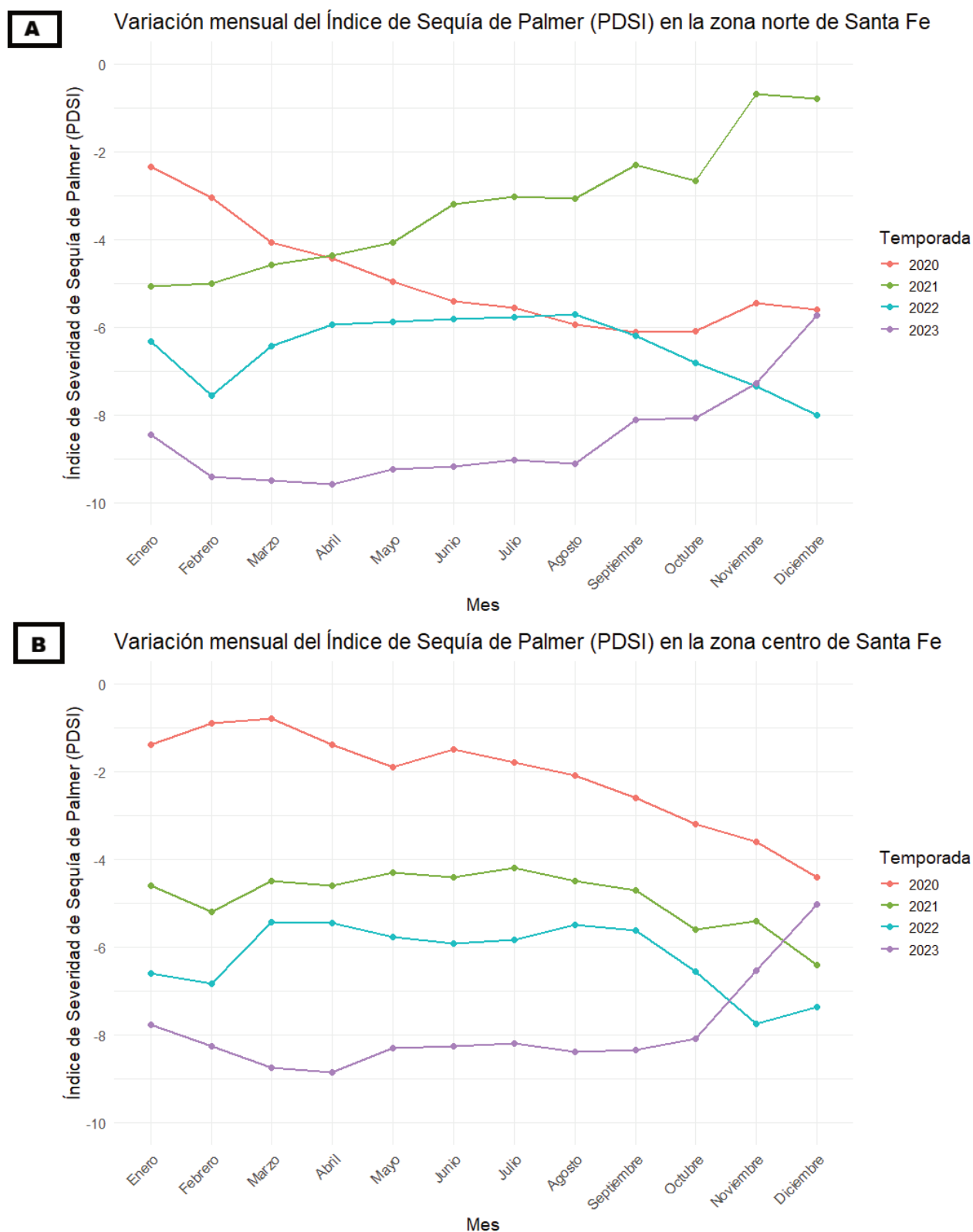


Figura 22: Variación mensual del índice de Sequía de Palmer (PDSI) de las diferentes temporadas de estudio. A) Variación mensual del PDSI por temporada en la zona norte de la provincia de Santa Fe, B) variación mensual del PDSI por temporada en la zona centro de la provincia de Santa Fe.

2.4.2. Perfil de Ácidos grasos en la yema de huevo de nidos de las diferentes temporadas

Los resultados indican diferencias en los porcentajes de ácidos grasos entre las distintas temporadas reproductivas ($R^2 = 0,52$; $F_{3,33} = 18,76$; $p = 0,001$). En el análisis de patrones multinivel se indentificaron asociaciones para 22 de los 26 ácidos grasos y relaciones estudiadas, incluyendo asociaciones exclusivas a una temporada y asociaciones compartidas entre temporadas (Tabla 7). El PERMANOVA por pares encontró que todas las temporadas diferían entre sí (Tabla 8). El grado de esta diferencia varió entre comparaciones, siendo más marcado entre las temporadas 2021 y 2023 ($R^2 = 0,61$), 2020 y 2023 ($R^2 = 0,62$), más leve entre 2022 y 2023 ($R^2 = 0,19$) y entre 2020 y 2021 ($R^2 = 0,24$). También se realizó un PERMANOVA entre las últimas tres temporadas con los nidos de El Fisco y para las dos primeras temporadas para los nidos colectados de Los Amores. Para los nidos colectados exclusivamente en El Fisco en las últimas tres temporadas (2021, 2022 y 2023) hubo diferencias entre todas las temporadas, ($R^2 = 0,44$; $F = 16,05$; $p = 0,001$) siendo más marcadas entre los años 2021 y 2023. Para los nidos colectados exclusivamente en Los Amores, también hubo diferencias entre las temporadas 2020 y 2021 ($R^2 = 0,28$; $F = 15,61$; $p = 0,003$), sin embargo, en este caso, la diferencia entre los nidos dentro de los grupos fue mayor que la de las temporadas ($R^2 = 0,62$; $F = 17,32$; $p = 0,001$). Para la temporada 2020, Los Amores y Cacique Ariacaiquín tuvieron perfiles de ácidos grasos similares ($R^2 = 0,22$; $F = 20,71$; $p = 0,100$), sin embargo, las diferencias estuvieron marcadas por los nidos ($R^2 = 0,74$; $F = 68,73$; $p = 0,020$). Para el año 2021 donde se colectaron nidos tanto de El Fisco como de Los Amores, el lugar afectó el perfil de ácidos grasos de los nidos ($R^2 = 0,50$, $F = 25,82$, $p = 0,001$) pero también los nidos difirieron entre ellos ($R^2 = 0,34$; $F = 9,03$; $p = 0,002$).

El NMDS también muestra las diferencias entre temporadas, donde las dos primeras temporadas (2020-2021) se agrupan hacia los valores negativos sobre la coordenada NMDS 1, mientras que las temporadas 2022 y 2023 agrupan hacia los valores positivos, lo que respalda los resultados del PERMANOVA (Fig. 23).

Tabla 7: Ácidos grasos asociados a las diferentes temporadas reproductivas de *Caiman latirostris* estudiadas mediante un análisis de patrones multinivel.

Temporadas	Ácidos grasos	Coefficiente de correlación (r.g)	Valor p
2020	<i>16:1 n-9</i>	0,934	0,0001
	<i>20:0</i>	0,872	0,0001
	<i>18:1 n-9</i>	0,517	0,0086
2021	<i>22:6 n-3 (DHA)</i>	0,688	0,0004
	<i>20:3 n-6</i>	0,619	0,0007
	<i>22:5 n-6</i>	0,607	0,0013
	<i>AGPI n-3</i>	0,566	0,0030
2022	<i>AGS</i>	0,791	0,0001
2023	<i>AGMI</i>	0,515	0,0105
2020 & 2021	<i>20:4 n-6 (AA)</i>	0,895	0,0001
	<i>20:3 n-3</i>	0,754	0,0001
	<i>AGPI</i>	0,698	0,0001
	<i>17:0</i>	0,670	0,0009
	<i>AGPI n-6</i>	0,630	0,0001
2020 & 2023	<i>n-6/n-3</i>	0,463	0,0290
2021 & 2022	<i>20:5 n-3 (EPA)</i>	0,489	0,0162
	<i>18:3 n-3</i>	0,488	0,0176
2022 & 2023	<i>16:0</i>	0,886	0,0001
	<i>18:1 n-7</i>	0,784	0,0001
	<i>16:1 n-7</i>	0,774	0,0001
	<i>20:1 n-9</i>	0,734	0,0001
	<i>14:0</i>	0,592	0,0017

AA: ácido araquidónico; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; AGS: ácidos grasos saturados; DHA: ácido docosahexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico. El coeficiente de asociación r.g indica la fuerza del vínculo entre cada ácido graso y temporada y combinaciones de ellas, combinando su fidelidad y especificidad. Valores cercanos a 1 indican una mayor asociación del ácido graso con la temporada considerada. En la tabla se muestran aquellos ácidos grasos que están asociación la o las temporadas estudiadas. Se resaltan con negrita los valores de $p < 0,05$.

Tabla 8: Resultado del Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (PERMANOVA) por pares para ácidos grasos de la yema de huevos entre las temporadas estudiadas. Se resaltan con negrita los valores de $p < 0,05$.

Temporadas	R ²	F	Valor p
2020 - 2021	0,24	6,33	0,005
2020 - 2022	0,40	17,97	0,001
2020 - 2023	0,62	21,07	0,001
2021 - 2022	0,40	26,24	0,001
2021 - 2023	0,61	41,36	0,001
2022 - 2023	0,19	7,91	0,002

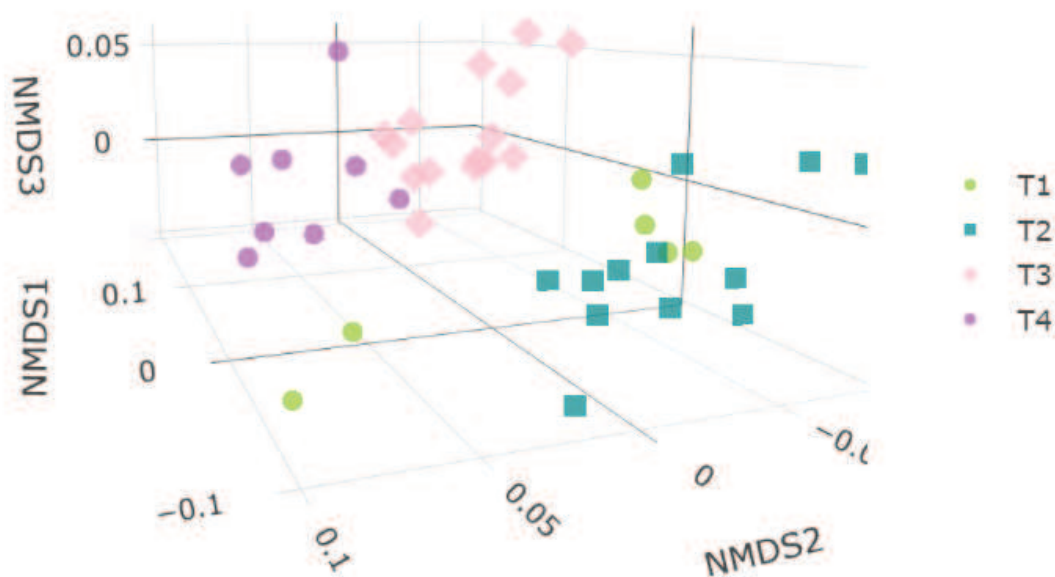


Figura 23: Análisis de ordenamiento multidimensional no métrico (NMDS) en 3 dimensiones de los ácidos grasos de las diferentes temporadas. Los círculos verdes representan la temporada (2020), los cuadrados azules a la temporada (2021), los diamantes rosa a la temporada (2022) y los círculos violeta a la temporada (2023) (Stress = 0,09411). Para visualizar la figura interactiva y rotarla desde cualquier ángulo, acceder a: <https://rpubs.com/florrvalli/1354827>.

2.4.3. Concentración de hormonas esteroideas en la yema de huevo de nidos de las diferentes temporadas

No se encontraron diferencias entre las cuatro temporadas reproductivas estudiadas para las concentraciones de E_2 ($\chi^2_3 = 0,4858$; $p = 0,922$) ni tampoco para T ($\chi^2_3 = 6,8968$; $p = 0,0753$) invertidas en los huevos del yacaré overo.

Al restringir el análisis únicamente a los nidos provenientes de la Reserva El Fisco (presentes en las dos últimas temporadas y de forma parcial en la segunda temporada) se observaron diferencias para T entre la segunda y la tercera temporada (2021-2022) y entre las dos últimas temporadas (2022-2023) ($\chi^2_2 = 7,56$; $p = 0,023$). Por el contrario, no se observaron diferencias entre las dos primeras temporadas (2020-2021) para los nidos colectados en la localidad de Los Amores con respecto a T ($F_{1,10} = 0,01$; $p = 0,944$).

Para el E_2 , no se encontraron diferencias entre los nidos de El Fisco en las últimas tres temporadas ($\chi^2_1 = 0,13$; $p = 0,939$), ni para Los Amores en las primeras dos temporadas ($F_{1,10} = 0,26$; $p = 0,6592$).

Para la temporada 2020, tampoco detectaron diferencias entre los distintos lugares estudiados para E_2 ($F_{1,12} = 0,22$; $p = 0,669$) ni para T ($F_{1,13} = 0,05$; $p = 0,844$). Lo mismo para la temporada 2021, donde tampoco se observaron diferencias entre nidos de diferentes localidades para E_2 ($F_{1,10} = 0,01$; $p = 0,930$) ni para T ($F_{1,10} = 0,85$; $p = 0,454$).

2.4.4. Porcentaje de hembras de las diferentes temporadas analizadas

Se encontraron diferencias en el porcentaje de hembras entre las diferentes temporadas, cuyos nidos fueron incubados a una temperatura constante de 32°C ($F_{3,17} = 4,31$; $p = 0,0196$; Tabla 9). Las temporadas 2020 y 2021 presentaron un porcentaje de hembras mayor en comparación con las temporadas 2022 y 2023.

Tabla 9: Porcentaje de hembras producidas en las diferentes temporadas reproductivas de *Caiman latirostris* estudiadas.

Temporada	Porcentaje de hembras (%)
2020	76,67 ± 32,04 ^a
2021	76,00 ± 21,90 ^a
2022	32,00 ± 22,80 ^b
2023	31,00 ± 34,05 ^b

2.4.5. Relación entre variables climáticas, ácidos grasos y porcentaje de hembras de los nidos

El ACP, realizado para explorar la relación entre la temperatura media (previa a la oviposición), los ácidos grasos presentes en la yema de huevo y el porcentaje de hembras producidas por nido, explicó el 61,5 % de la varianza total de los datos (Fig. 24, Anexo II: Tabla 9). El porcentaje de hembras se asoció con una menor proporción de los ácidos grasos 16:0 ($p = 0,0190$) y 16:1 n-7 ($p = 0,0296$), y con mayores temperaturas medias en los meses de septiembre ($p = 0,0206$) y octubre ($p = 0,0153$). A su vez, cuando las temperaturas medias de abril y septiembre fueron mayores, los nidos también presentaron menores proporciones de los ácidos grasos 16:0 ($p_{\text{abril}} = 0,0017$; $p_{\text{sep}} = 0,0003$), 16:1 n-7 ($p_{\text{abril}} = 0,0185$; $p_{\text{sep}} = 0,0248$) y mayores porcentajes de 22:6 n-3 ($p_{\text{abril}} = 0,0425$; $p_{\text{sep}} = 0,0232$). Por su parte, a mayores temperaturas medias de octubre los nidos presentaron una menor proporción del ácido graso 16:0 ($p = 0,0304$). Finalmente, mayores temperaturas medias de abril, septiembre y octubre se relacionaron con una mayor proporción de 20:5 n-3 en la yema de los huevos ($p_{\text{abril}} = 0,0025$; $p_{\text{sep}} = 0,0001$; $p_{\text{oct}} = 0,0079$).

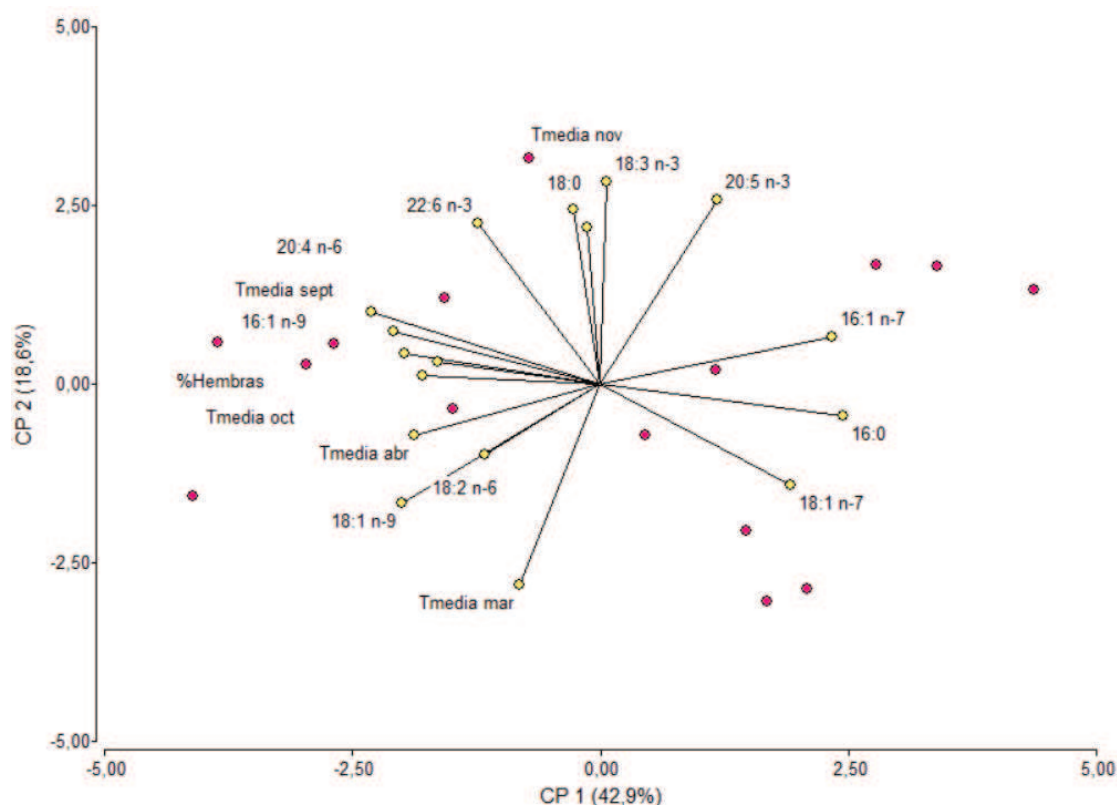


Figura 24: Análisis de componentes principales entre las temperaturas medias de los meses previos a la oviposición de *Caiman latirostris*, ácidos grasos en la yema de huevo y porcentaje de hembras de cada nido. Tmedia mar: temperatura media de marzo; Tmedia abr: temperatura media de abril; Tmedia sept: temperatura media de septiembre; Tmedia oct: temperatura media de octubre; Tmedia nov: temperatura media de noviembre. Cada punto rosa representa a un nido.

El ACP para la relación entre las precipitaciones, los ácidos grasos y el porcentaje de hembras representó el 58,8% de la varianza total de los datos (Fig. 25; Anexo II: Tabla 10). A mayores precipitaciones acumuladas de abril, las yemas de los huevos tuvieron mayores proporciones de 20:5 n-3 ($p = 0,0232$). Por otro lado, a mayores precipitaciones acumuladas en septiembre los nidos presentaron mayores porcentajes del AGPI 22:6 n-3 ($p = 0,0047$) y menores porcentajes de 16:0 ($p = 0,0334$). A mayores precipitaciones acumuladas en noviembre los nidos presentaron un menor contenido de 16:0 ($p = 0,0023$) y 16:1 n-7 ($p = 0,0076$), y una mayor proporción de 18:1 n-9 ($p = 0,0084$) y el 20:4 n-6 ($p = 0,0018$).

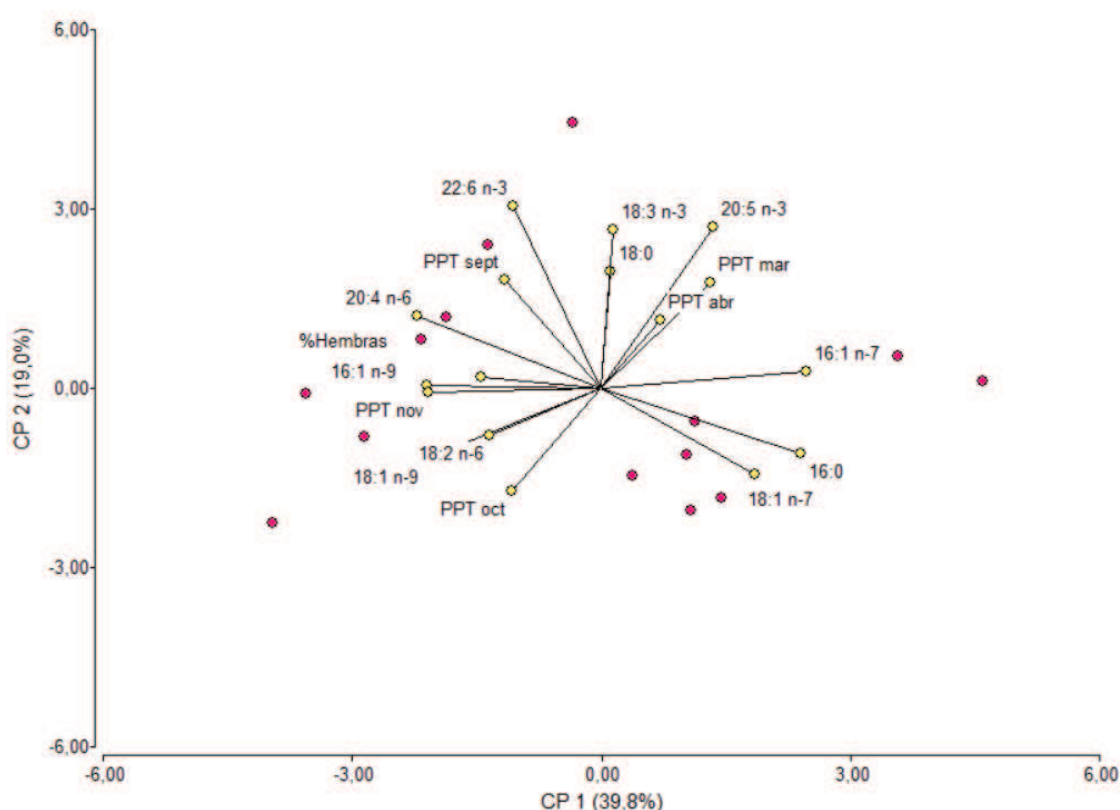


Figura 25: Análisis de componentes principales entre las precipitaciones acumuladas de los meses previos a la oviposición, ácidos grasos en la yema de huevo y porcentaje de hembras de cada nido de *Caiman latirostris*. PPT mar: precipitaciones acumuladas de marzo; PPT abr: precipitaciones acumuladas de abril; PPT sept: precipitaciones acumuladas de septiembre; PPT oct: precipitaciones acumuladas de octubre; PPT nov: precipitaciones acumuladas de noviembre. Cada punto rosa representa a un nido.

2.4.6. Relación entre variables climáticas, hormonas esteroides y porcentaje de hembras

El ACP para la relación entre las variables climáticas, las hormonas esteroides y el porcentaje de hembras representó un 63,8% de la varianza de los datos (Fig. 26; Anexo II: Tabla 11). El E_2 en la

yema de huevo no se vió influenciado por ninguna de las variables climáticas en los meses previos a la oviposición. Cuando hubo mayores precipitaciones acumuladas en septiembre ($p = 0,0152$) y octubre ($p = 0,0152$) y ($p = 0,0230$) previas a la oviposición, las hembras reproductoras invirtieron una mayor cantidad de T en sus huevos, mientras que a mayores temperaturas medias en marzo, invirtieron una mayor cantidad de T ($p = 0,0214$) y mayores temperaturas medias en noviembre invirtieron menor cantidad de T ($p = 0,0029$).

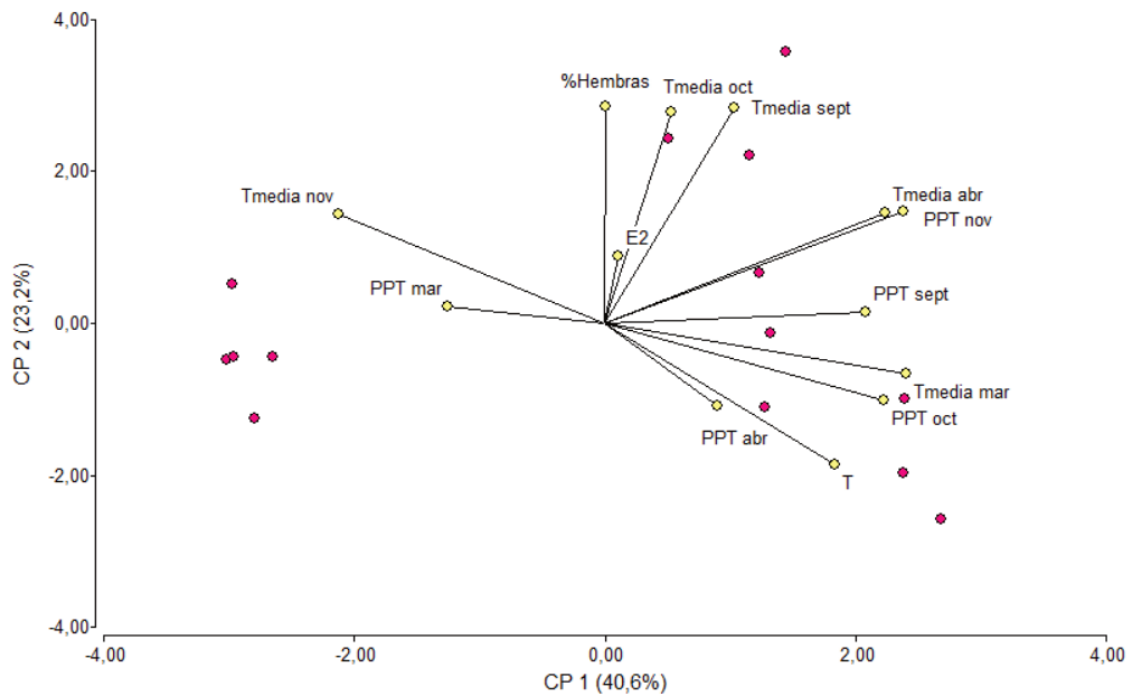


Figura 26: Análisis de componentes principales entre las variables climáticas (precipitaciones acumuladas y temperaturas medias) de los meses previos a la oviposición, hormonas esteroides en la yema de huevo y porcentaje de hembras de cada nido de *Caiman latirostris*. E₂: 17β-estradiol; T: testosterona. PPT mar: precipitaciones acumuladas de marzo; PPT abr: precipitaciones acumuladas de abril; PPT sept: precipitaciones acumuladas de septiembre; PPT oct: precipitaciones acumuladas de octubre; PPT nov: precipitaciones acumuladas de noviembre. Tmedia mar: temperatura media de marzo; Tmedia abr: temperatura media de abril; Tmedia sept: temperatura media de septiembre; Tmedia oct: temperatura media de octubre; Tmedia nov: temperatura media de noviembre. Cada punto rosa representa a un nido.

2.5. Discusión

2.5.1. Caracterización climática de las temporadas de estudio

Durante la primera temporada (2020), predominaron condiciones relativamente favorables, iniciando con una fase Neutra con una transición hacia La Niña débil a moderada. Esta transición se reflejó en valores de PDSI negativos en ambas zonas, tanto norte como centro de la provincia de Santa Fe, que indican una sequía no tan severa. En 2021, la influencia de La Niña fue más marcada (de moderada a fuerte), lo que resultó en condiciones más secas, especialmente en la zona centro, donde se observaron valores de PDSI más negativos durante casi todo el año. En contraste, la zona norte mostró cierta recuperación a partir de mediados de año, reflejando una mejora relativa de la situación hídrica ya que el valor del PDSI fue mayor en comparación con la zona centro. Las temporadas 2022 y 2023 estuvieron dominadas por La Niña fuerte (2022) y La Niña moderada con transición a Neutra y El Niño (2023). Estos años se destacaron por presentar sequías extremas y persistentes en ambas zonas, con valores de PDSI muy bajos.

2.5.2. Ácidos grasos y hormonas esteroides de la yema de huevo en las diferentes temporadas

Cada temporada se asoció con diferentes contenidos de ácidos grasos, identificando diferencias entre todas las temporadas de estudio. Específicamente, las temporadas 2020 y 2021 estuvieron asociadas con una mayor inversión de AGPI, mientras que las temporadas 2022 y 2023 estuvieron representadas por una inversión de AGS y AGMI respectivamente. Cabe destacar que los nidos correspondientes a las dos primeras temporadas fueron recolectados en diferentes localidades: en 2020, en Los Amores y Cacique y en 2021, en Los Amores y en la reserva natural El Fisco. En contraste, en las dos últimas temporadas, todos los nidos fueron recolectados exclusivamente en la reserva natural El Fisco. Los análisis revelaron que hubo diferencias entre todas las temporadas estudiadas, pero también tanto el sitio de recolección como las diferencias entre nidos dentro de cada sitio influyeron sobre los ácidos grasos de la yema de huevo. Por lo tanto, las diferencias observadas entre temporadas no pueden atribuirse únicamente a factores climáticos, ya que también se identificaron influencias del sitio de recolección y variabilidad entre nidos dentro de una misma temporada.

En cuanto a las hormonas esteroides, no se encontraron diferencias en las concentraciones de E₂ y T en las yemas de los huevos de nidos de yacaré overo en las diferentes temporadas reproductivas. Sin embargo cuando se estudió a nivel local, solo se encontraron diferencias para T para El Fisco entre las diferentes temporadas. En general, el E₂ mantiene un perfil estable a lo largo de las temporadas y lugares estudiados, mientras que la T, mostró variaciones que parecen estar asociadas a condiciones locales como disponibilidad de recursos, estrés, accesos a cuerpos de agua. Esta disparidad sugiere que la falta de un patrón general interanual para la T podría enmascarar respuestas

específicas a nivel micro-geográfico. Es posible que las distintas áreas estudiadas respondan de manera diferencial a las condiciones climáticas de cada temporada. Así, la variabilidad local de la T en sitios como El Fisco se perdería al analizar los promedios generales de las diferentes temporadas, haciéndose visible solo cuando se examina cada localidad de forma independiente.

2.5.3. Relación entre las variables climáticas, ácidos grasos depositados en la yema de huevo y porcentaje de hembras de los nidos

Las temperaturas medias más altas en septiembre y octubre estuvieron asociadas con nidos con mayores porcentajes de hembras y a su vez, tanto las temperaturas medias de septiembre y octubre como los nidos con menores porcentajes de hembras se asociaron con menores porcentajes de 16:0 y 16:1 n-7 en la yema de huevo. En el capítulo anterior (Capítulo 1) se observó sólo relación entre porcentaje de hembras con 16:0 pero no con 16:1 n-7. Esto se debe a que en el análisis del presente capítulo se incluyó un nido adicional del cual se contaba con los datos sólo del perfil de ácidos grasos de la yema y la proporción sexual de las crías producidas, pero no con los niveles hormonales.

En cuanto a las precipitaciones de los meses previos a la oviposición, no se encontró relación con el porcentaje de hembras producidas en los nidos, pero si con la disponibilidad de 16:0, ya que en los meses de septiembre y noviembre con menores precipitaciones se asociaron a nidos con menores porcentajes de este ácido graso. Incluso también, mayores precipitaciones de noviembre se asociaron a aquellos nidos con menores porcentajes de 16:1 n-7.

Temperaturas medias más altas y mayores precipitaciones acumuladas en los meses previos a la oviposición se relacionaron con nidos con mayores contenidos de AGPI como el 20:4 n-6, 20:5 n-3 y 22:6 n-3. Las mayores temperaturas en abril y septiembre se asociaron con nidos con mayor contenido de 22:6 n-3 y las de abril, septiembre y octubre con nidos con un mayor porcentaje de 20:4 n-6. Precipitaciones mayores acumuladas en abril se relacionaron con nidos con mayor porcentaje de 20:5 n-3, las de septiembre con nidos con mayor porcentaje de 22:6 n-3 y las de noviembre con nidos con nidos con mayores porcentajes de 20:4 n-6 y 18:1 n-9 (Fig. 27).

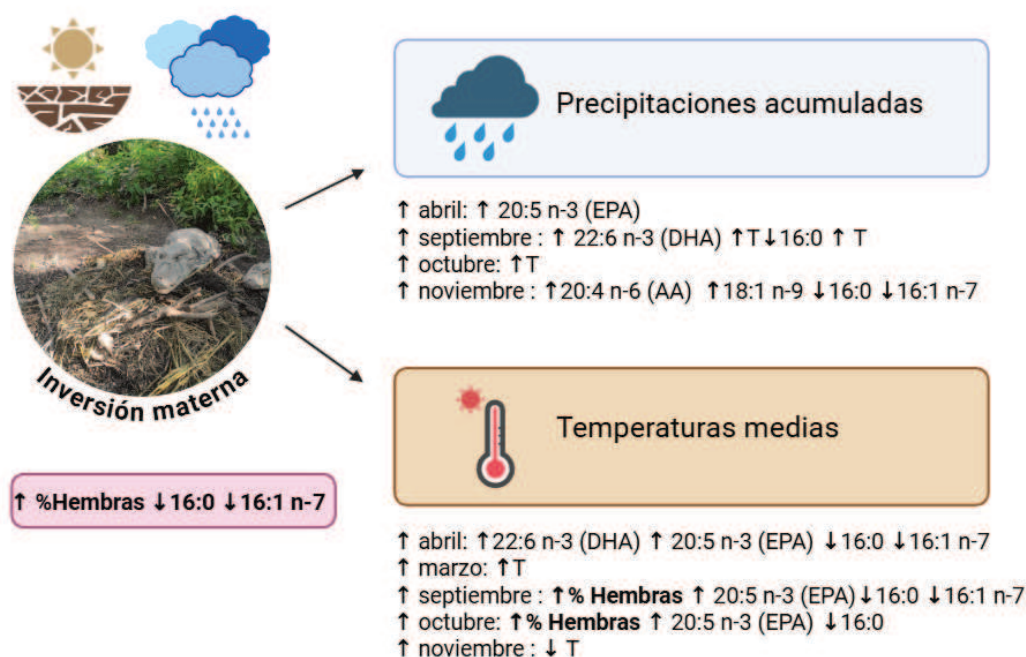


Figura 27: Resumen gráfico de la influencia de las condiciones climáticas previas a la oviposición sobre la inversión materna de ácidos grasos, hormonas esteroides y porcentaje de hembras en hembras reproductivas de *Caiman latirostris*. AA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, EPA: ácido eicosapentaenoico, T: testosterona.

Se encontró una asociación con temperaturas medias más cálidas y mayores precipitaciones acumuladas en los meses previos a la oviposición con un mayor contenido de AGPI en las yemas de los huevos. Esto podría relacionarse con una mayor disponibilidad de presas que contienen estos ácidos grasos cuando se dan estas condiciones climáticas, de las cuales se alimentarían las hembras. Los resultados de este estudio coinciden con los publicados por Leiva (2019) donde asocia AGPI en yema con las precipitaciones de marzo-abril y septiembre-octubre, proponiendo que cuando estos meses previos a la oviposición son lluviosos, habría mayor disponibilidad de presas ricas en AGPI en la naturaleza o de su precursor, el 18:3 n-3. Los cocodrilianos son considerados carnívoros oportunistas, ya que consumen presas en función de la disponibilidad ambiental (Grigg y Kirshner, 2015) y se ha documentado que modifican su dieta según las condiciones climáticas, alternando entre presas acuáticas y terrestres (Pierini et al., 2025). Por ejemplo, Campos et al. (2006) estudiaron la dieta de *Caiman crocodilus* en el Pantanal y registraron que en épocas de sequía y niveles bajos de agua, los animales consumían más vertebrados terrestres, mientras que en épocas de aguas altas y temperaturas elevadas aumentaba el consumo de peces. Otros estudios, en *Melanosuchus niger*, *C. crocodilus* y *Paleosuchus palpebrosus*, observaron un mayor consumo de presas acuáticas (crustáceos y peces) durante las épocas secas (González, 2010; Laverty & Dobson, 2013). Por lo antes mencionado, se propone que durante los meses más cálidos, las hembras habrían tenido un mayor

acceso a presas acuáticas, como moluscos, crustáceos y peces, ricos en AGPI, lo que se reflejó en la composición lipídica de la yema.

Cabe destacar que el cambio climático y las condiciones climáticas extremas como temperaturas altas extremas afectan la producción de AGPI en el fitoplancton y en otros organismos acuáticos (Hixson & Arts, 2016; Calderini et al., 2023; Tan et al., 2024; Boyen et al., 2024). Esto podría tener consecuencias importantes para las especies situadas en niveles tróficos superiores, que dependen de estos ácidos grasos esenciales para mantener condiciones fisiológicas óptimas (Hixson & Arts, 2016). En este sentido, es posible que el menor contenido de AGPI observado en las temporadas con sequías extremas también se vea influenciado por una reducción en la disponibilidad de estos ácidos grasos en el ambiente acuático. El perfil de ácidos grasos de las presas no fue analizado directamente en este estudio, la interpretación de los resultados se sustenta en antecedentes ecológicos y estudios previos sobre la composición de las presas de *Caiman latirostris*, como de otros cocodrilianos (González, 2010; Laverty & Dobson, 2013; Pierini et al., 2025).

2.5.4. Relación de las variables climáticas con las hormonas esteroideas depositadas en la yema de huevo y porcentaje de hembras producidas en los nidos

En cuanto a E_2 no se encontró relación entre su concentración en la yema de huevo y las temperaturas y precipitaciones previas a la oviposición. Por el contrario, para la T se encontró una relación positiva con las precipitaciones de septiembre y octubre y con las temperaturas medias de marzo y una relación negativa con las temperaturas medias de noviembre. Pero la T no se relacionó con el porcentaje de hembras de los nidos, lo que concuerda con los resultados del Capítulo 1, donde no se halló relación con el porcentaje de hembras producidas en los nidos.

Los estudios sobre concentraciones séricas de T en hembras de cocodrilianos son escasos, siendo más común su análisis en machos. En *Alligator mississippiensis*, se ha reportado que los niveles de T aumentan durante la vitelogénesis tardía en hembras reproductoras (Guillette et al., 1997; Milnes & Moore, 2024). Aunque no está completamente dilucidado el rol de la T en hembras, este pico indicaría que cumple un rol fisiológico activo durante el desarrollo folicular. La T es precursora directa del E_2 mediante la acción de la enzima aromatasa, por lo que su incremento podría estar reflejando una mayor actividad ovárica. Además, se ha demostrado que condiciones de estrés reducen las concentraciones plasmáticas de T en machos de *A. mississippiensis* (Lance & Elsey, 1986), así como en otros reptiles como las tuátaras y tortugas (Guillette et al., 1995). En la paloma *Columbia livia*, las hembras pueden modular la deposición de hormonas esteroideas en respuesta a condiciones alimentarias desfavorables (Hsu et al., 2016). En este sentido, la mayor deposición de T en nidos puestos durante los meses con mayores precipitaciones (septiembre y octubre) y temperaturas medias más elevadas en abril podría estar asociada a una mayor disponibilidad de alimento en el ambiente, lo que implicaría una mejor condición fisiológica de las hembras y una

reducción del estrés fisiológico. Por lo tanto, en hembras reproductoras con mejores condiciones fisiológicas o que tuvieron acceso a una mayor diversidad de alimentos por condiciones ambientales favorables, este pico de T previo a la vitelogénesis podría ser mayor. Esto coincide con el estudio publicado por Leiva et al. (2023), donde plantea que los meses lluviosos previos a la oviposición favorecen la condición fisiológica de la hembra. A pesar de que en este estudio no se cuenta con información sobre la condición fisiológica de las hembras, ésta respuesta podría interpretarse como una forma de optimizar la inversión reproductiva bajo condiciones ambientales favorables.

Cabe aclarar que los resultados obtenidos corresponden a años con condiciones de sequía, lo que limita la comparación con escenarios de mayor humedad. Sin embargo, estudios en la tortuga *Chrysemys picta*, donde las hembras fueron expuestas experimentalmente a temperaturas altas y bajas durante la época reproductiva, tampoco evidenciaron variaciones en las concentraciones de hormonas esteroides en sangre (Topping & Valenzuela, 2023). Esto sugiere la posible existencia de mecanismos fisiológicos que estabilizan la producción y transferencia de hormonas esteroides frente a variaciones ambientales de temperaturas. No obstante, el estudio llevado a cabo por Topping & Valenzuela (2023) se desarrolló bajo condiciones controladas de alimentación, por lo que no refleja posibles efectos de estrés asociados a la falta de recursos alimenticios.

Los resultados del presente estudio indican que el E₂ podría desempeñar un rol más directo en la determinación sexual de las crías, si bien no se encontró relación con las variables climáticas previas a la oviposición, en el Capítulo 1 se informó una relación polinómica entre el E₂ y el porcentaje de hembras de los nidos. Mientras que la T, a pesar de su sensibilidad a condiciones ambientales, no estaría involucrada directamente la determinación sexual. La falta de relación entre E₂ y las variables climáticas sugiere un posible control endógeno o una estabilidad de esta hormona frente a las temperaturas ambientales. En cambio, la relación de la T con las precipitaciones y temperaturas podría reflejar una respuesta fisiológica materna al ambiente.

2.5.5. Efecto del ambiente sobre la proporción de hembras producidas en los nidos

En resumen, las temperaturas medias más altas durante los meses de septiembre y octubre estuvieron asociadas a un mayor porcentaje de hembras. A su vez, la proporción de hembras disminuyó a lo largo de los cuatro años del estudio, todos marcados por el fenómeno climático de La Niña. Es importante aclarar que esta coincidencia no implica una relación estadística ni causal, sino que constituye una observación descriptiva que deberá ser evaluada en futuros estudios específicos. Las temperaturas medias altas de septiembre y octubre, junto con el porcentaje de hembras, se asociaron con una menor inversión de 16:0 y 16:1 n-7 en la yema del huevo. Tal como se planteó en el Capítulo 1, la inversión materna de 16:0 estaría influida por las condiciones ambientales anteriores a la oviposición, dado que en meses más cálidos y con mayores precipitaciones previos a la

oviposición se asociaron con una menor cantidad de este ácido graso en la yema de huevo, lo que podría estar afectando indirectamente la proporción sexual de la nidada.

El 16:0 está presente en una amplia variedad de alimentos naturales, especialmente en grasas animales y vegetales, y su disponibilidad varía en función de las condiciones ambientales (Murru et al., 2022). Como se mencionó en el Capítulo 1, esta especie se alimenta principalmente de insectos, y las condiciones de sequías extremas podrían aumentar la disponibilidad de ácidos grasos como el 16:0 y 16:1 n-7, disminuyendo así la incorporación de otras especies ricas en ácidos grasos como los AGPI por parte de la hembra, lo que se reflejaría en la composición de la yema de huevo. Una posible interpretación es que la calidad y cantidad de los lípidos disponibles en el huevo podrían modular el desarrollo sexual del embrión. En este sentido, las madres podrían estar ajustando su inversión energética en función de las condiciones ambientales del entorno, lo cual influiría sobre el sexo de la descendencia.

En cuanto a las temporadas analizadas, se encontraron diferencias marcadas en la proporción de hembras producidas en nidos incubados a temperaturas constantes de 32°C. Los resultados muestran una tendencia decreciente a lo largo del tiempo; en los años 2020 y 2021 se registraron promedios de 76,7% y 76% de hembras, respectivamente, mientras que en las dos temporadas siguientes los promedios descendieron a 32% y 31%. De forma similar, Simoncini et al. (2014) reportaron proporciones de hembras del 70% en nidos incubados en la naturaleza, y observaron que eventos de La Niña intensos y prolongados, se correlacionan con condiciones térmicas del nido que tienden a reducir la proporción de hembras. De manera similar, Rhodes y Lang (1996) informaron que, en años secos, los nidos naturales de *Alligator mississippiensis* también producen menos crías hembras. Asimismo, Bock et al. (2020) proyectan un aumento en la proporción de machos en las poblaciones de *A. mississippiensis* hacia 2050, como consecuencia del calentamiento global. Diversos estudios han señalado que la temperatura del aire influye fuertemente en la temperatura del nido en la naturaleza, la cual es el principal factor que incide en la determinación sexual en cocodrilianos (Simoncini et al., 2014; Bock et al., 2020). En este contexto, resulta llamativo que los resultados del presente estudio, obtenidos bajo condiciones de incubación artificial controlada, reflejen patrones similares a los observados en nidos incubados en la naturaleza. Esto sugiere que además del ambiente térmico que influye sobre las condiciones del nido, hay un efecto materno que influye sobre la determinación sexual. Es decir, factores maternos podrían estar modulando el desarrollo sexual embrionario, conduciendo a una mayor proporción de crías macho en años con condiciones ambientales desfavorables previas a la oviposición. Tanto E₂ como el ácido graso 16:0 podrían ser factores maternos que modulen la determinación sexual, pero pueden no ser los únicos, también podrían estar actuando otros componentes de origen materno, como, por ejemplo, la corticosterona, un glucocorticoide que ha demostrado sesgar el sexo hacia machos en *Caiman latirostris* (Viotto et al., en revisión).

La ventaja de producir una mayor proporción de crías hembras en la naturaleza radicaría en que, si estas sobreviven, podrían traducirse en un mayor número de nidos (Simoncini et al., 2014). Sin embargo, diversos estudios han reportado que las hembras de cocodrilianos presentan una mayor mortalidad que los machos durante los primeros meses de vida (Lance et al., 2000; Bock et al., 2023), lo que sugiere que una mayor proporción de crías machos podría resultar en una mayor supervivencia juvenil en ambientes naturales con condiciones extremas de sequía y temperatura. Esta estrategia de producción sesgada hacia los machos podría garantizar la supervivencia de la población durante los años con condiciones climáticas extremas, al asegurar que los machos sobrevivan y lleguen a la madurez reproductiva. Sin embargo, dado que los cocodrilianos son animales longevos, este sesgo podría representar más bien una estrategia de corto plazo para asegurar la supervivencia de los animales nacidos bajo estas condiciones climáticas extremas. En el caso de los cocodrilianos, las temperaturas productoras de machos son más altas que las temperaturas de desarrollo de hembras, confiriéndoles un menor período de incubación, minimizando el costo de desarrollo embrionario y contribuyendo a una mayor masa y reservas de vitelo a las crías. En el caso de esta especie, los machos maduran más tarde que las hembras (Verdade et al., 2003). Por lo tanto, este mecanismo podría representar una estrategia para priorizar la supervivencia de los animales por encima de la determinación sexual en condiciones ambientales extremas, como las sequías, en un proceso determinado tanto por las condiciones climáticas como por la inversión materna.

Capítulo 3: Cambios en los niveles de hormonas esteroides y ácidos grasos durante el desarrollo embrionario de *Caiman latirostris*

3.1. Introducción

Los componentes de la yema de huevo en las especies amnióticas son vitales para el correcto desarrollo del embrión. En *Caiman latirostris*, como se detalla en el Capítulo 1, la hembra invierte ácidos grasos y hormonas esteroides que están relacionadas con el porcentaje de hembras que se producen en los nidos. Cada especie se caracteriza por la forma en que el embrión absorbe y procesa la yema de huevo, pero en general, en las especies ovíparas el consumo de la yema se acelera en las últimas etapas de desarrollo (Noble et al., 1990).

El saco vitelino está implicado en la absorción y procesamiento de la yema. En *Alligator mississippiensis* se ha estudiado el patrón de absorción de la yema por parte del embrión, y se observó que el saco vitelino está rodeado por vasos sanguíneos que contienen células endodérmicas con capacidad fagocítica. Estas células forman estructuras filamentosas, similares a hebras de espagueti, que rodean la cavidad del saco vitelino. A partir de estas hebras, el vitelo extracelular comienza a ser rodeado e incorporado por las células durante el desarrollo embrionario. Además, estas estructuras estarían implicadas en el procesamiento de la yema, ya que al encontrarse en contacto con capilares sanguíneos permitirían el transporte de los productos metabólicos hacia el embrión a través del torrente sanguíneo (Blackburn, 2021).

La membrana corioalantoidea (MCA) se forma a partir de la fusión del alantoide y el corion y está implicada en el intercambio gaseoso y excreción (Webb et al., 1987). En *Caiman latirostris* su formación tiene lugar durante el estadio 8 de desarrollo (Iungman et al., 2008). Si bien se desconoce donde se captan y metabolizan las hormonas esteroides durante el desarrollo embrionario, un posible candidato es la MCA (Milnes & Moore, 2024). En *Alligator mississippiensis* se ha detectado en la MCA la expresión de enzimas esteroidogénicas, entre ellas la aromatasa, y también receptores de hormonas como los de la progesterona (RP), glucocorticoides (RG), andrógenos (RA) y receptores de estrógenos (RE) (Cruze et al., 2013). Por lo tanto, la MCA tendría la capacidad de regular, sintetizar y responder a las señales hormonales.

Noble et al. (1990) estudiaron el metabolismo lipídico en la yema de huevo de *Alligator mississippiensis* durante el desarrollo embrionario y describieron una absorción activa de lípidos a partir del día 56 de desarrollo. Al principio del desarrollo embrionario los lípidos más abundantes en la yema de huevo fueron los triglicéridos y fosfoglicéridos mientras que al final la yema presentó un mayor contenido de ésteres de colesterol. Además, no notaron cambios en los ácidos grasos que componían los triglicéridos y fosfolípidos durante el desarrollo embrionario, pero si hubo un aumento de ésteres de colesterol que mostraron mayor contenido de 18:1 n-9. Además, Leiva (2019) estudió la utilización de ácidos grasos en la yema hacia el final del desarrollo embrionario en el yacaré overo

asociándolos con el éxito de eclosión de los nidos. Cuanto mayor fue el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) 18:2 n-6 (ácido linoleico), 18:3 n-3 (ácido α -linolénico) y 22:6 n-3 (ácido docosahexaenoico, DHA) en la yema del huevo de los embriones en estadios finales previos a la eclosión, menor fue el éxito de eclosión. Por lo tanto, la presencia y absorción de estos ácidos grasos es esencial para el correcto desarrollo del embrión. Por otro lado, mayores porcentajes de 20:4 n-6 (ácido araquidónico, AA) en la yema se asoció con un mayor éxito de eclosión en los días finales de desarrollo y estaría relacionado con el aumento del tamaño de las crías. Sin embargo, no hay registros que estudien lo que ocurre durante el período termosensible (PTS) en *Caiman latirostris* y si tiene alguna inferencia sobre la determinación sexual.

Por otro lado, Conley et al. (1997) estudiaron la dinámica de las hormonas esteroides como androstenediona, estradiol (E_2) y testosterona (T) en la yema de huevo durante el desarrollo embrionario de *Alligator mississippiensis* a temperaturas productoras de hembras y machos. Observaron que los niveles de todos los esteroides disminuían entre los estadios 16 y 25, siendo la caída más pronunciada durante los estadios 21 y 23, que corresponden al PTS y al inicio de los primeros signos morfológicos de diferenciación gonadal. Con base en estos hallazgos, los autores propusieron que los esteroides presentes en la yema podrían actuar como sustratos metabolizados por el embrión, influyendo potencialmente en la determinación sexual. Entre ellos, el E_2 se perfila como el principal candidato, ya que se ha demostrado que concentraciones no fisiológicas de esta hormona pueden afectar la determinación sexual e incluso revertir el sexo a temperaturas masculinas hasta el estadio 25 de desarrollo (Pieau et al., 1994; Kohno et al., 2020). Además, a concentraciones fisiológicas, el E_2 es el esteroide que muestra mayor variabilidad entre nidos (Conley et al., 1997).

Numerosos estudios han investigado los mecanismos moleculares mediante los cuales el E_2 actúa e influye en la determinación sexual de reptiles con determinación sexual por temperatura (DST), basándose principalmente en diseños experimentales que emplean concentraciones no fisiológicas de la hormona o la aplicación de inhibidores de la aromatasa (Ramsey & Crew, 2009; Durando et al., 2013; Canesini et al., 2018; Wu et al., 2022; Wang et al., 2025). Wang et al. (2025) estudiaron como el E_2 en concentraciones no fisiológicas influye sobre la DST en la tortuga *Trachemys scripta elegans*. Estos autores encontraron que el E_2 actúa a través de los RE y a temperaturas productoras de machos regula positivamente los genes *cyp19a1* y *foxl2* y negativamente *amh* y *dmrt1*, induciendo la diferenciación ovárica.

En el Capítulo 1 se abordó la inversión materna de ácidos grasos y hormonas esteroides, como E_2 y T, en la yema de huevo del yacaré overo y su relación con la determinación sexual. En el presente capítulo se analizarán las variaciones en el contenido de hormonas esteroides y ácidos grasos en la yema, así como la expresión de genes vinculados a la determinación sexual en el complejo gónada-adrenal-mesonefros (GAM) durante el desarrollo embrionario, poniendo especial énfasis en el PTS.

3.2. Objetivos

- Estudiar la variación de las hormonas esteroides y ácidos grasos en la yema de huevo de *Caiman latirostris* incubados a 32°C durante el desarrollo embrionario, específicamente durante el Período termosensible (PTS).
- Determinar la expresión de genes implicados en la determinación sexual en el complejo gónada-adrenal-mesonefros (GAM) de embriones de *Caiman latirostris* incubados a 32°C durante el PTS.
- Evaluar la expresión de genes de enzimas esteroidogénicas, como aromatasa (*cyp19a1*) y 5 α -reductasa (*srd5a1*), en el GAM de embriones de *Caiman latirostris* incubados a 32°C durante el PTS, para investigar su posible papel en la determinación sexual.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Toma de muestras

Para esta parte del estudio, se eligieron 9 nidos utilizados previamente en los capítulos anteriores de los que se tomaron muestras durante el desarrollo embrionario para estudiar específicamente qué sucede con la utilización de ácidos grasos, hormonas esteroides en la yema de los huevos y con los genes relacionados con la determinación sexual en el complejo GAM de embriones de *Caiman latirostris*. Se tomaron muestras de yema correspondientes a la inversión materna de huevos que se encontraban en un estadio de desarrollo menor a 5 y luego durante el PTS al inicio (estadio 19), mitad (estadio 21) y final (estadio 24) de nidos incubados a temperaturas constantes de 32°C (incubadora 1: 32,04 $\pm$ 0,05°C; incubadora 2: 32,09 $\pm$ 0,02°C; incubadora 3: 32,19 $\pm$ 0,03°C.). Además, durante el PTS también se obtuvieron muestras del complejo GAM de los embriones. Se seleccionaron estos estadios porque: en el estadio 19 la gónada aún está indiferenciada y comienza el PTS; en el estadio 21 se inicia la formación de estructuras específicas de cada sexo (determinación sexual); y en el estadio 24 cuando ya se encuentra determinado el sexo del embrión, la gónada comienza su evolución (Iungman, 2012). Para corroborar que los embriones estaban en el estadio correcto se utilizó como criterio de clasificación el trabajo de Iungman et al. (2008) que describe los 28 estadios embrionarios de la especie (Tabla 10). Luego de la eclosión se sexaron cinco individuos por nido como detallamos en el Capítulo 1 sección 1.3.2 (Fig. 28).

Tabla 10: Características morfométricas y morfológicas utilizadas para determinar el estadio de desarrollo embrionario en *Caiman latirostris* (Iungman et al., 2008).

	Estadio 5	Estadio 19	Estadio 21	Estadio 24
LDC	2,2 mm	15,4 mm	20 mm	26,5 mm
LCR	6,9 mm	54,7 mm	66,4 mm	124,0 mm
Características morfológicas	- 36 pares de somitos - Cuerpo rotado completamente hacia la izquierda excepto la cola. - Primordios en las extremidades anteriores.	- Crestas digitales convexas - Mandíbulas rectas y la inferior se extiende detrás de la superior - Se observan pigmentación tenue en dorso del hocico, el cráneo y las extremidades.	- El embrión posee un aspecto marrón, con pigmentación en los márgenes de la mandíbula superior y escamas grandes pigmentadas en el dorso. - Órganos abdominales no visibles. - Se observan primordio de uñas en dedos 1–3.	- El embrión posee pigmentación marrón oscura con manchas en la mandíbula. - El tejido superior del párpado contiene escamas y está pigmentado. - Comienzan a ser visibles las dobles escamas de la cola, mientras que las simples en el extremo distal están bien marcadas.

LDC: largo dorso-craneal, LCR: longitud cráneo-rabadilla.

3.3.2. Perfil de ácidos grasos durante los diferentes estadios de desarrollo

La metodología utilizada para determinar los ácidos grasos de la yema del huevo fue la descrita en el Capítulo 1, sección 1.3.3.1. Como se mencionó previamente, se utilizaron 9 nidos de los cuales se tomaron muestras de 3 huevos por estadio de desarrollo en cada nido.

3.3.3. Determinación de hormonas esteroides durante los diferentes estadios de desarrollo

La metodología utilizada para determinar E₂ y T fue la descrita en el Capítulo 1, sección 1.3.3.2. Se utilizaron 9 nidos de los cuales se tomaron muestras de 3 huevos por estadio de desarrollo en cada nido.

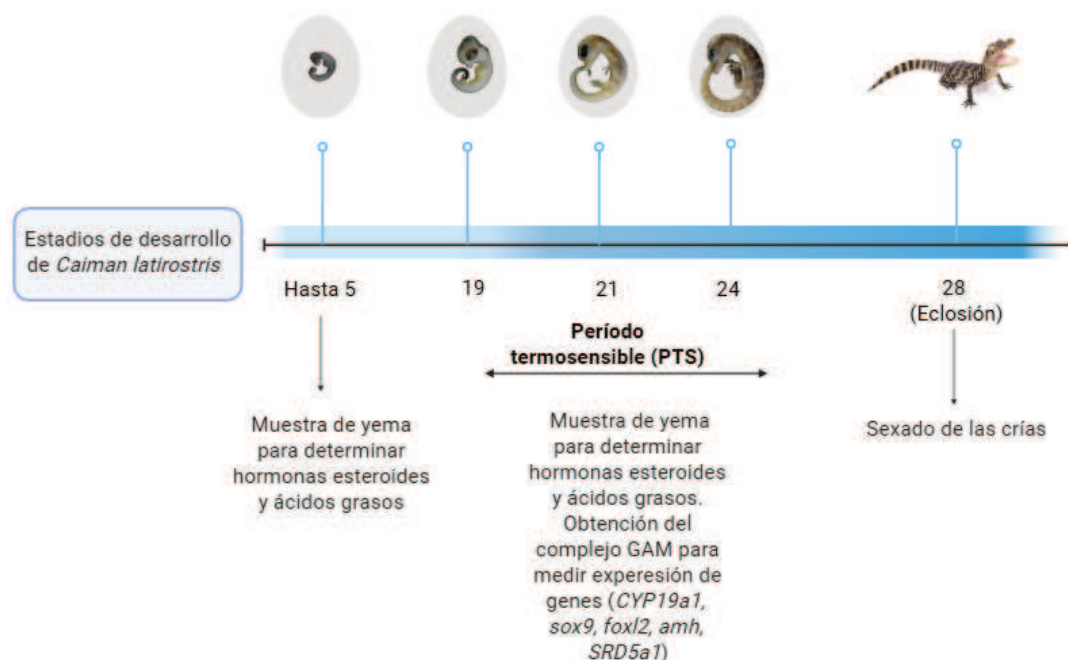


Figura 28: Esquema metodológico de la toma de muestras de yema y complejo gónada-adrenal-mesonefros (GAM) durante el desarrollo de embriones de *Caiman latirostris*. *Amh*: gen que codifica para la hormona anti-mülleriana; *cyp19a1*: gen que codifica para la enzima aromatasa; *foxl2*: gen que codifica para el factor de transcripción Forkhead box protein L2; GAM: complejo gónada-adrenal-mesonefros; *srd5a1*: gen que codifica para la enzima para la enzima 5- α reductasa; *sox9*: gen que codifica para SRY-Box Transcription Factor 9.

3.3.4. Expresión de genes relacionados con la determinación sexual

Se analizó la expresión de genes relacionados con la DST en el complejo GAM de embriones de *Caiman latirostris* durante el inicio (estadio 19), mitad (estadio 21) y final (estadio 24) del PTS (Fig 29). Los genes seleccionados fueron: *amh* y *sox9*, involucrados en la red génica de determinación masculina; *foxl2* y *cyp19a1* (que codifica la enzima aromatasa), que participan en la red génica de determinación femenina; y *srd5a1*, que codifica la enzima 5- α reductasa, responsable de la conversión de T en DHT.

Para el análisis de expresión génica se utilizaron dos nidos, excepto para *cyp19a1* donde se agregó un nido más y se determinó la expresión sólo en los estadios 19 y 21. Para cada nido y estadio se tomaron muestras del complejo GAM de 3 embriones. Además, otras 8 muestras de GAM fueron destinadas a la puesta a punto de la técnica. En el estadio 19 se obtuvo la región del torso debido a la dificultad que implica aislar el GAM en etapas tempranas del desarrollo. En los estadios 21 y 24 se obtuvo la gónada junto con el complejo adrenal-mesonefros, procurando retirar la mayor cantidad posible de este tejido. No obstante, a este material se lo denominará GAM, considerando la complejidad de separar por completo dicho tejido de la gónada.

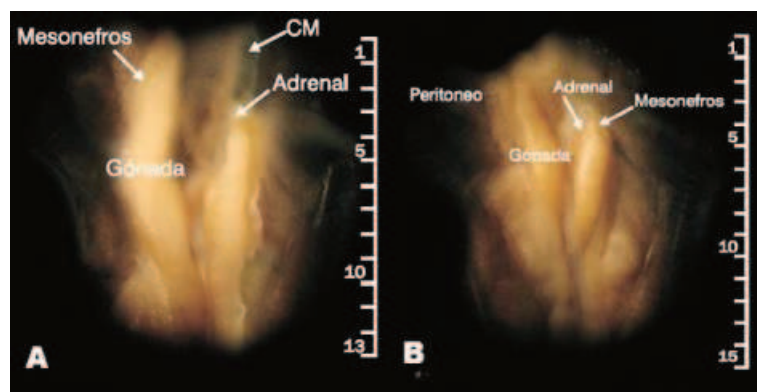


Figura 29: Complejo gónada–adrenal–mesonefros (GAM) en neonatos de *Caiman latirostris* visto a través de lupa estereoscópica. A) Complejo GAM de una hembra recién nacida. B) Complejo GAM de un macho recién nacido. CM: conducto de Müller. Figura obtenida de Iungman, 2012.

Para la extracción de ARN del complejo GAM se pesaron entre 60 y 100 mg de tejido, el cual se homogeneizó en trizol y se extrajo el ARN en fase orgánica con cloroformo. Posteriormente a la cuantificación se corroboró la pureza del ARN por espectrometría (260 y 280 nm) y las muestras se guardaron a -80°C hasta la retrotranscripción. Se utilizó 1 μg de ARN, la enzima retro transcriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV), hexanucleótidos al azar y cuatro trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTPs) para la obtención de ADN copia (ADNc). También se cuantificó el grado de recuperación de ADN mediante espectrometría para verificar la eficiencia de la retrotranscripción. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta la realización de la PCR.

Se utilizaron HOT FIREPol® EvaGreen® qPCRMix Plus (ROX) (Solis Biodyne) para realizar la PCR a tiempo real en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems™). También se incluyeron controles negativos con agua destilada en todos los ensayos. Se programó el software del termociclador para realizar un primer paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min, y luego para repetir ciclos de reacción sucesivos de desnaturalización a 96°C durante 15 s, hibridación a $51\text{--}61^{\circ}\text{C}$ durante 15 s, y elongación a 72°C durante 15 s. La pureza de los productos de amplificación fue chequeada mediante análisis de curvas de disociación (curva de melting). Se obtuvo el ciclo umbral (Ct) de cada muestra mediante el software StepOne (versión 2.3). Para determinar la eficiencia de amplificación y cuantificar la expresión, se prepararon diluciones seriadas del ADNc a partir de un pool de muestras para cada gen, y se construyó una curva estándar graficando los valores de Ct frente al $\log_{10}$ de la dilución (Anexo III: Figuras 1 a 5). Se calculó la expresión de los genes de interés mediante el método relativo de la curva estándar (Cikos et al., 2007) y se normalizó la expresión utilizando como gen de referencia a la proteína ribosomal 60S L8 (Katsu et al., 2004).

En la Tabla 11 se detallan los primers utilizados y la temperatura de hibridación de los mismos para cada uno de los genes estudiados. Estos primers ya habían sido diseñados previamente mediante el uso de secuencias de *Alligator mississippiensis* y probados en diferentes tejidos de yacaré overo, excepto *srd5a1*. Dado que el genoma de *Caiman latirostris* no se encuentra secuenciado, la secuencia

codificante para el gen *srd5a1* fue obtenida a partir de su ortólogo predicho en *A. mississippiensis* (número de acceso de RefSeq: XM_006271131.3). Para el diseño de los primers, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de *srd5a1* de reptiles cercanos filogenéticamente, tanto de secuencias de nucleótidos como de aminoácidos. Los primers fueron diseñados para hibridar en regiones altamente conservadas entre especies, con el fin de maximizar la probabilidad del éxito de la amplificación.

Tabla 11: Descripción de primers utilizados para realizar la técnica de PCR en tiempo real con la temperatura de hibridación correspondiente.

Gen	Primer forward	Primer reverse	Temperatura (°C)
<i>L8</i>	CTCACAATCCTGAAACCAAG	CACGACCAGCCTTTAAGATA	52
<i>Amh</i>	TCCACCCGTGCCGACTACTA	CAGAGTATTGGACGGGCACG	60
<i>Cyp19a1</i>	CTGGAGATGATGATCGCTGC	TGGCATGTCATCGCTCTGTA	55
<i>Foxl2</i>	GCAAGTTCCCCTTCTACG	AAGCACTCGTTGAGGCTG	51,5
<i>Sox9</i>	GGCTCGGAGCAAACCCACAT	TGCCAGGCTGGACGTCTGTT	61
<i>Srd5a1</i>	GGGTATTTACAAGGTCGGAGC	ATACCAATCAGCCATCCTGC	51

Amh: gen que codifica para la hormona anti-mülleriana; *cyp19a1*: gen que codifica para la enzima aromatasa; *foxl2*: gen que codifica para el factor de transcripción Forkhead box L2; *L8*: gen que codifica para la proteína ribosomal 60S L8 (housekeeping); *Sox9*: SRY-box transcription factor 9; *Srd5a1*: enzima 5- α reductasa.

3.3.5. Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (PERMANOVA) entre los diferentes estadios de desarrollo con el fin de identificar posibles cambios en el perfil de ácidos grasos asociados al progreso del desarrollo embrionario. Los análisis fueron llevados a cabo mediante el paquete vegan (Oksanen et al., 2005) y utilizando la matriz de disimilitud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Para analizar diferencias individuales entre los ácidos grasos, hormonas esteroideas y genes relacionados con la determinación sexual se utilizaron GLMMs, considerando a los estadios como efecto fijo y a los nidos como efecto aleatorio. Para los ácidos grasos se utilizó la regresión beta y para las hormonas y los genes regresión gaussiana. Para realizar la regresión beta se empleó la función `glmmTMB` del paquete `glmmTMB` (Brooks et al., 2017). Para verificar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para la regresión gaussiana, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Bartlett, respectivamente. Para aquellos casos en el que los datos ajustaron a una distribución gaussiana la función utilizada fue `lme` del paquete `nlme` (Pinheiro & Bates, 2023). Para determinar las diferencias entre los 3 nidos para la expresión de la *cyp19a1* se realizó un ANOVA. Cuando los datos no ajustaron a ninguna distribución se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-

Wallis. Para realizar los gráficos se empleó el paquete ggplot2 (Wickham, 2009). Los análisis y gráficos presentados fueron realizados con software Rstudio (versión 4.3.0).

3.4. Resultados

3.4.1. Variación de ácidos grasos durante el PTS

No se encontraron diferencias en el perfil de ácidos grasos entre los distintos estadios de desarrollo embrionario analizados ($R^2 = 0,03$; $F = 1,31$; $p = 0,2750$). Sin embargo, se encontraron variaciones en 13 ácidos grasos en la yema de huevo a medida que avanzó el desarrollo embrionario. Hubo una disminución de los AGPI tanto de la serie n-3 como n-6. (Tabla 12 y Anexo III: Tabla 12).

Tabla 12: Cambios en el porcentaje ácidos grasos (media de % de FAME $\pm$ desvío estándar) de la yema de huevo de *Caiman latirostris* desde la inversión hasta el final del período termosensible (PTS).

Ácidos grasos	Inversión	Estadio 19	Estadio 21	Estadio 24	Estadístico de prueba (χ^2_3)	Valor p
14:0	0,87 $\pm$ 0,18 ^a	0,88 $\pm$ 0,24 ^a	0,92 $\pm$ 0,22 ^a	0,77 $\pm$ 0,15 ^b	18,76	<0,001
15:0	0,60 $\pm$ 0,27	0,50 $\pm$ 0,19	0,56 $\pm$ 0,14	0,48 $\pm$ 0,17	2,98	0,3955
16:0	23,83 $\pm$ 2,89	23,69 $\pm$ 3,21	23,93 $\pm$ 2,77	24,05 $\pm$ 2,89	1,29	0,7316
16:1 n-7	8,79 $\pm$ 2,83 ^a	8,53 $\pm$ 2,67 ^{ab}	8,83 $\pm$ 2,93 ^{ab}	8,24 $\pm$ 3,03 ^b	10,29	0,0162
16:1 n-9	0,27 $\pm$ 0,20 ^a	0,32 $\pm$ 0,19 ^a	0,29 $\pm$ 0,21 ^a	0,24 $\pm$ 0,22 ^b	21,45	<0,001
18:0	5,88 $\pm$ 0,49 ^c	6,04 $\pm$ 0,59 ^{bc}	6,20 $\pm$ 0,52 ^{ab}	6,44 $\pm$ 0,45 ^a	46,56	<0,001
18:1 n-7	9,44 $\pm$ 1,66 ^b	9,42 $\pm$ 1,32 ^b	10,10 $\pm$ 1,25 ^a	9,86 $\pm$ 1,49 ^{ab}	13,47	0,0373
18:1 n-9	26,64 $\pm$ 3,41 ^{ab}	26,44 $\pm$ 3,16 ^{ab}	25,62 $\pm$ 3,86 ^b	27,8 $\pm$ 3,77 ^a	8,59	0,0353
18:2 n-6	9,01 $\pm$ 2,21	9,18 $\pm$ 2,03	8,89 $\pm$ 2,43	9,49 $\pm$ 2,49	5,94	0,1147
18:3 n-3	4,39 $\pm$ 0,56 ^a	4,38 $\pm$ 0,59 ^a	4,18 $\pm$ 0,60 ^{ab}	4,05 $\pm$ 0,51 ^b	20,24	<0,001
20:0	0,08 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03	7,42	0,0597
20:1 n-9	0,32 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,17	0,36 $\pm$ 0,17	0,36 $\pm$ 0,14	4,62	0,2022
20:2 n-6	0,20 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,06	6,48	0,0902
20:3 n-3	0,21 $\pm$ 0,09 ^b	0,22 $\pm$ 0,06 ^a	0,19 $\pm$ 0,08 ^{bc}	0,18 $\pm$ 0,06 ^c	35,34	<0,001
20:3 n-6	0,35 $\pm$ 0,09 ^{ac}	0,36 $\pm$ 0,08 ^a	0,32 $\pm$ 0,08 ^{bc}	0,31 $\pm$ 0,07 ^b	32,76	<0,001
20:4 n-6 (AA)	3,07 $\pm$ 0,78 ^a	3,13 $\pm$ 0,80 ^a	2,68 $\pm$ 0,64 ^b	2,56 $\pm$ 0,57 ^b	56,14	<0,001
20:5 n-3 (EPA)	1,18 $\pm$ 0,64 ^a	1,14 $\pm$ 0,52 ^a	1,06 $\pm$ 0,45 ^{ab}	0,87 $\pm$ 0,43 ^b	7,70	0,0036
22:5 n-6	0,54 $\pm$ 0,13 ^{ab}	0,56 $\pm$ 0,13 ^a	0,49 $\pm$ 0,10 ^b	0,44 $\pm$ 0,10 ^c	39,23	<0,001
22:6 n-3 (DHA)	1,61 $\pm$ 0,50 ^{ab}	1,71 $\pm$ 0,43 ^a	1,52 $\pm$ 0,35 ^b	1,40 $\pm$ 0,43 ^c	46,07	<0,001
^a Σ AGS	31,26 $\pm$ 3,26	31,20 $\pm$ 3,37	31,70 $\pm$ 2,83	31,88 $\pm$ 2,94	3,36	0,3399
^b Σ AGMI	45,47 $\pm$ 1,96	45,09 $\pm$ 1,50	45,21 $\pm$ 1,34	45,77 $\pm$ 1,38	7,24	0,0647
^c Σ AGPI	20,59 $\pm$ 2,63 ^a	21,18 $\pm$ 3,20 ^a	19,50 $\pm$ 2,61 ^b	19,57 $\pm$ 2,54 ^b	33,44	<0,001
^d Σ AGPI n-3	7,39 $\pm$ 1,41 ^a	7,45 $\pm$ 1,08 ^a	6,94 $\pm$ 1,03 ^b	6,53 $\pm$ 0,98 ^b	55,18	<0,001
^e Σ AGPI n-6	13,20 $\pm$ 2,40 ^{ab}	13,74 $\pm$ 2,82 ^a	12,56 $\pm$ 2,62 ^b	13,05 $\pm$ 2,58 ^{ab}	14,50	0,0023

$\sum n-6/n-3$	$1,85 \pm 0,53^b$	$1,87 \pm 0,45^b$	$1,86 \pm 0,52^b$	$2,05 \pm 0,55^a$	19,04	<0,001
----------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------	------------------

En negrita se destacan aquellos ácidos grasos en los que se obtuvieron diferencias ($p < 0,05$). Letras indican diferencias entre los estadios. AA: ácido araquidónico, AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, DHA: ácido docosahexaenoico, EPA: ácido eicosapentaenoico.

^a $\sum AGS$: 14:0 + 15:0 + 16:0 + 18:0 + 20:0

^b $\sum AGMI$: 16:1 n-9 + 16:1 n-7 + 18:1 n-9 + 18:1 n-7 + 20:1 n-9.

^c $\sum AGPI$: 18:2 n-6 + 18:3 n-3 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:5 n-6 + 22:6 n-3.

^d $\sum AGPI$ n-3: 18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3.

^e $\sum AGPI$ n-6: 18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6.

^f $\sum n-6/\sum n-3$: (18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6)/(18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3).

3.4.2. Variación de hormonas esteroideas durante el PTS

Durante el PTS la concentración de E_2 en la yema disminuyó entre los estadios 19 y 21 de incubación ($H_3 = 50,325$; $p < 0,001$), es decir, desde el inicio hacia la mitad del PTS (Fig. 30 A). A diferencia de los resultados obtenidos con E_2 , en el caso de la T hubo un aumento en las concentraciones con respecto a la inversión materna y los estadios 21 y 24 ($F_{3,50} = 20,17$; $p < 0,001$) (Fig. 30 B).

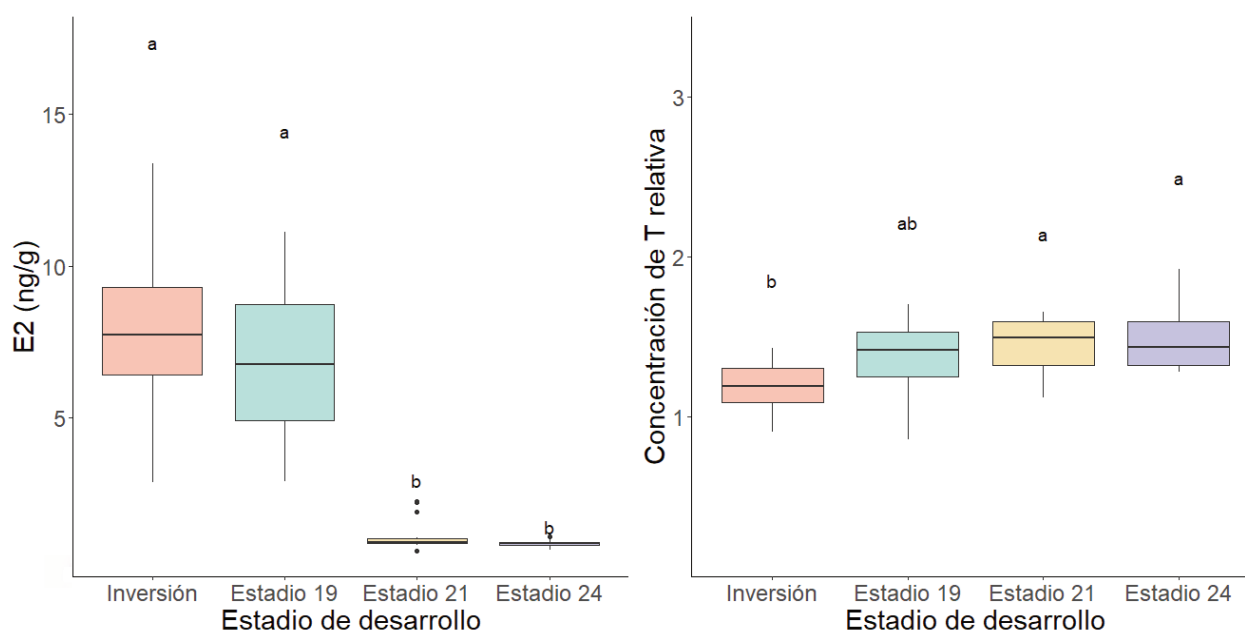


Figura 30: Cambios en las concentraciones de estradiol (E_2) y testosterona (T) en la yema de huevo de *Caiman latirostris* al inicio del desarrollo embrionario y durante el inicio, mitad y final del periodo termosensible (PTS). Letras indican diferencias entre los estadios.

3.4.3. Expresión de genes relacionados con la determinación sexual durante el PTS

No hubo diferencias en la expresión de *amh* en el GAM de los embriones durante el PTS ($F_{2,15} = 0,33$; $p = 0,7208$) pero si para *sox9*, cuya mayor expresión se registró en el estadio 19 ($F_{2,15} = 7,10$; $p = 0,0287$; Fig. 31). Para *cyp19a1*, la expresión también fue mayor durante el estadio 19 ($F_{2,14} = 7,65$; $p = 0,0221$) y para *foxl2* hubo diferencias entre los estadios 21 y 24 (Fig. 32). No se pudo detectar la expresión del gen *srd5a1* en ninguna de las muestras analizadas.

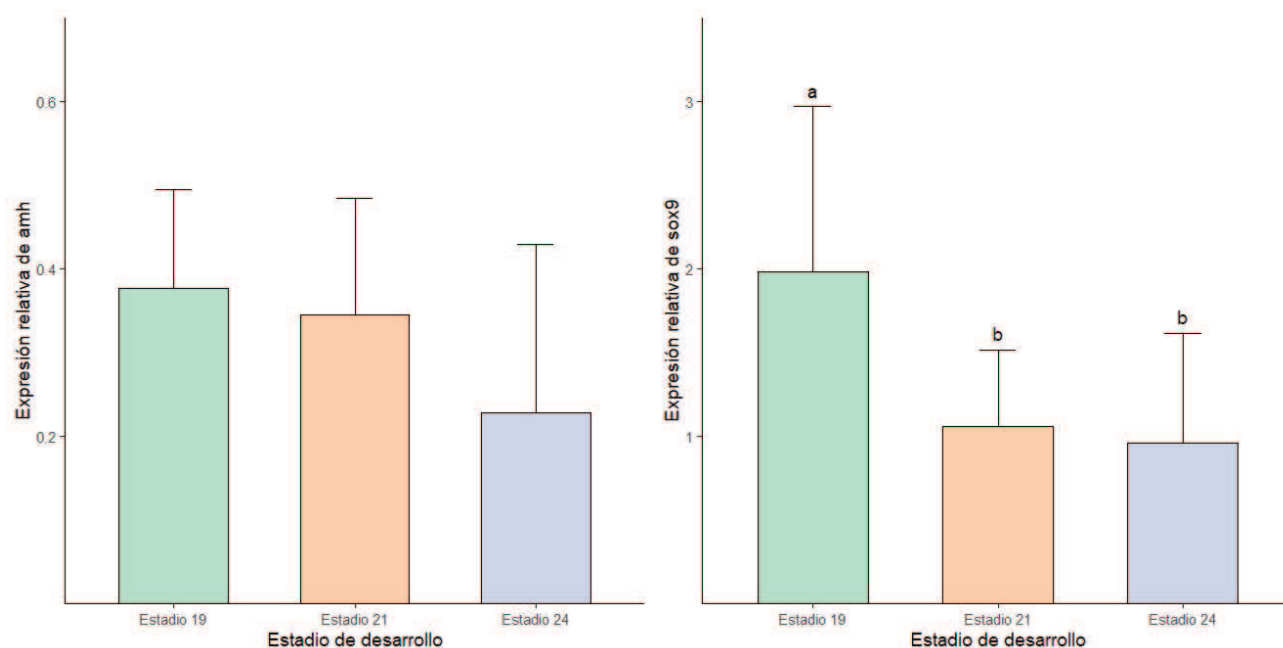


Figura 31: Expresión relativa de los genes *amh* y *sox9* en el complejo gónada-adrenal-mesonefros (GAM) de embriones de *Caiman latirostris* durante los estadios 19, 21 y 24 correspondientes al inicio, mitad y final del período termosensible. Letras distintas indican diferencias entre los estadios.

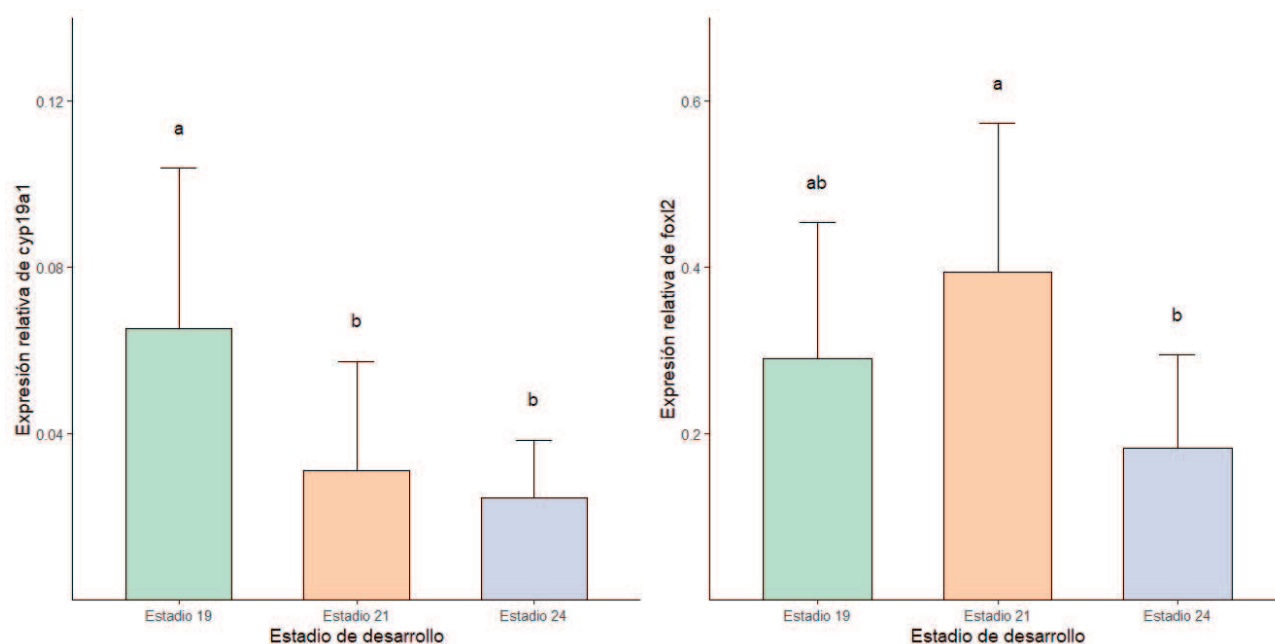


Figura 32: Expresión relativa de los genes *cyp19a1* y *foxl2* en el complejo gónada-adrenal-mesonefros (GAM) de embriones de *Caiman latirostris* durante los estadios 19, 21 y 24 correspondientes al inicio, mitad y final del período termosensible. Las letras distintas indican diferencias entre los estadios.

Los 3 nidos elegidos para estudiar la expresión de *cyp19a1*, no presentaron diferencias en cuanto a la concentración de E_2 ($F_{2,6} = 0,98$; $p = 0,4388$) ni de T ($F_{2,6} = 0,66$; $p = 0,5500$) invertidas en la yema de huevo por la hembra. Si difirieron en cuanto al porcentaje de 16:0 en la yema de huevo, que fue mayor para el nido 10 en comparación con los otros nidos (Tabla 13).

En cuanto a la expresión de *cyp19a1* en el complejo GAM de los embriones se estudió la diferencia entre estadios dentro de cada nido. No hubo diferencias entre los diferentes estadios para el nido 1 ($F_{2,6} = 4,87$; $p = 0,055$) ni tampoco para los nidos 2 ($H_2 = 0,82$; $p = 0,7143$) y 10 ($F_{1,3} = 0,10$; $p = 0,7750$). También se analizó la diferencia entre nidos en los diferentes estadios. La expresión no fue diferente entre los nidos en el estadio 19, pero si en el estadio 21, donde el nido 10 tuvo los mayores niveles de expresión, seguidos por el nido 2 y luego por el nido 1 (Tabla 13).

Tabla 13: Información de los nidos de los cuales analizamos la expresión de la enzima aromatasa (*cyp19a1*) en los estadios 19 y 21.

Nido	E_2 (ng/g)	T (concentración relativa)	16:0	%Hembras	Expresión <i>cyp19a1</i> (Estadio 19)	Expresión <i>cyp19a1</i> (Estadio 21)
1	$6,25 \pm 1,92^a$	$1,29 \pm 0,36^a$	$21,12 \pm 0,03^b$	60	$0,059 \pm 0,029^a$	$0,0120 \pm 0,002^c$
2	$4,28 \pm 0,97^a$	$1,64 \pm 0,47^a$	$20,94 \pm 0,19^b$	80	$0,054 \pm 0,051^a$	$0,0230 \pm 0,005^b$
10	$5,69 \pm 0,87^a$	$1,43 \pm 0,25^a$	$26,12 \pm 2,02^a$	0	$0,082 \pm 0,041^a$	$0,0725 \pm 0,002^a$

Concentraciones de estradiol (E_2), testosterona (T) (media $\pm$ desvío estándar), porcentaje de 16:0 (media del % FAMES $\pm$ desvío estándar), porcentaje de hembras y expresión de *cyp19a1* que codifica para la enzima

aromatasa (expresión relativa $\pm$ desvío estándar) en los estadios 19 y 21 del periodo termosensible (PTS). Para E₂ ($F_{2,5} = 0,98$; $p = 0,4388$), T ($F_{2,6} = 0,66$; $p = 0,5500$), 16:0 ($F_{2,5} = 10,88$; $p = 0,0241$), expresión de *cyp19a1* estadio 19 ($H_2 = 1,87$; $p = 0,3932$), expresión de *cyp19a1* estadio 21 ($F_{2,5} = 146,55$; $p < 0,001$). Letras distintas indican diferencias entre los nidos.

3.5. Discusión

3.5.1. Variación de ácidos grasos durante el PTS

No se encontraron diferencias en los perfiles de ácidos grasos entre los diferentes estadios de desarrollo embrionario analizados. Este resultado es consistente con lo observado en *Alligator mississippiensis*, donde se reportó que la disminución del peso de la yema es lenta durante las primeras etapas y se vuelve abrupta recién a partir de los 56 días de desarrollo (Noble et al., 1993a). Sin embargo, de los 20 ácidos grasos analizados, 13 mostraron variaciones, sugiriendo que aunque el perfil se mantiene relativamente estable, algunos ácidos grasos específicos presentan variaciones durante el desarrollo.

Los AGPI de la serie n-3 disminuyeron en proporción al final del PTS, especialmente el 18:3 n-3, el 20:3 n-3, 20:5 n-3 y 22:6 n-3, lo que resultó en un aumento de la relación n-6/n-3. El consumo de AGPI, particularmente 18:3 n-3 y 22:6 n-3, por parte de los embriones de *Caiman latirostris* se ha relacionado con un mayor éxito de eclosión, debido a su relevancia biológica durante el desarrollo embrionario (Leiva, 2019). El 18:3 n-3 actúa como precursor del 20:5 n-3 y del 22:6 n-3, siendo este último un componente esencial de los fosfolípidos de membranas celulares y es fundamental para el desarrollo cerebral y de la retina durante la embriogénesis en vertebrados (Neuringer et al., 1998; Denyer, 2002; Lawniczak & Teece, 2009). Incluso a pesar de las diferencias en los ácidos grasos de nidos de cautiverio y naturaleza, al final del desarrollo embrionario en *Alligator mississippiensis* el tejido cerebral conserva la composición de ácidos grasos de los fosfoglicéridos ricos en 22:6 n-3 y en 20:4 n-6, mientras que el impacto de estas diferencias se ve reflejado en los tejidos lipídicos y hepáticos (Speake et al., 1994). Por lo tanto, sería coherente que esta baja de 22:6 n-3 se dirija hacia estos tejidos que demandan este tipo de ácidos grasos. Por otro lado, el 20:5 n-3 es absorbido por el embrión principalmente en los días finales del desarrollo embrionario, estando vinculado con el crecimiento de la cría en *C. latirostris* (Leiva, 2019). Sin embargo, en los resultados del presente trabajo se observa una baja de este ácido graso a finales del PTS. Esta disminución podría reflejar una redistribución del 20:5 n-3 hacia tejidos embrionarios en rápido desarrollo, como el cerebro, los ojos, el corazón y los pulmones, donde su incorporación a membranas celulares y su potencial papel como precursor de otros AGPI es importante durante este período (Speake et al., 1994; Lawniczak & Teece, 2009).

También disminuyeron los AGPI de la serie n-6 con variaciones en el porcentaje de 20:3 n-6 y 20:4 n-6 y 22:5 n-6. La disminución de ácidos grasos como el 20:4 n-6 y el 22:6 n-3 ha sido

documentada en pollos, donde la membrana del saco vitelino presenta una absorción preferencial de fosfatidilcolinas ricas en estos ácidos grasos. El 20:4 n-6 es, al igual que el 22:6 n-3, otro ácido graso esencial requerido por el embrión para su correcto desarrollo. Ambos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo cerebral y de otros órganos como el corazón y de los pulmones (Lawniczak & Teece, 2009).

La sumatoria de AGS y AGMI no se vio afectada durante el PTS. Por otro lado, se observó un aumento en el porcentaje de ácidos grasos como el 18:0 y el 18:1 n-9. Si bien, hay que tener cautela al interpretar los resultados debido a que los datos se encuentran expresados en porcentajes, los aumentos de 18:0 y 18:1 n-9 pueden estar relacionados con una baja de otros ácidos grasos que repercute en su aumento, o con una biosíntesis de ácidos grasos que podría estar mediada por el saco vitelino (Speake & Deans, 2004). Noble et al. (1990) encontraron que al final del desarrollo embrionario hay un aumento en la cantidad de ácidos grasos no esterificados y de ésteres de colesterol. Se cree que la acumulación de los ésteres de colesterol, que estaría mediada por la síntesis y acumulación de la membrana del saco vitelino, tendría como fin facilitar el transporte hacia el embrión. Estos ésteres de colesterol mostraron porcentajes más altos de 18:1 n-9, lo que coincide con el aumento de este ácido graso durante el estadio 24 de nuestro estudio. Noble et al. (1993a) han propuesto que este aumento de los ésteres de colesterol podría ser utilizado para sintetizar hormonas esteroideas, y por lo tanto podría tener un papel importante en la determinación sexual.

En este estudio no se observaron cambios en el porcentaje de 16:0 pero si en el 16:1 n-7 (ácidos grasos asociados a un menor porcentaje de hembras, explicado en los Capítulos 1 y 2). Es necesario aclarar que la absorción de yema durante el PTS implica un consumo de estas especies en términos absolutos, aunque el porcentaje dentro de estos ácidos grasos se mantenga igual, no implica que no haya un consumo o metabolización de los mismos durante el desarrollo embrionario. No hay registros acerca de como el 16:0 o 16:1 n-7 podrían influir en la determinación sexual. Para el pez cebra (*Danio rerio*) hay un reporte sobre la administración de dydrogesterona (progestágeno sintético) que indujo reversión sexual hacia machos, dentro de los metabolitos modificados que fueron propuestos para explicar la proporción sesgada de crías estuvo 16:1 n-7. El conjunto de metabolitos inhibiría vías como NF- κ B/COX-2 y Wnt/ β -catenina y activaría la vía de p53 lo que conduciría a la apoptosis de los ovocitos (Jiang et al., 2019). También, se ha registrado que los AGMI inducen la expresión de *sox9* e inhiben a *foxl2* en las células de la granulosa (Baddela et al., 2020). El 16:0 es un ácido graso que en proporciones muy altas induce estrés oxidativo debido a que produce lipotoxicidad, incluso durante el desarrollo embrionario (McKeegan & Sturme, 2011). El 16:1 n-7 se sintetiza a partir del 16:0 mediante la enzima estearoil-CoA desaturasa-1 (Δ^9 desaturasa) por lo que una mayor cantidad de 16:1 n-7 en nidos con mayor proporción de machos podría provenir del metabolismo del 16:0. Que el 16:0 produzca lipotoxicidad y a su vez un estrés oxidativo podría generar la síntesis de glucocorticoides

como la corticosterona por parte del embrión o depositados por la hembra, cuyo glucocorticoide sesga el sexo de la descendencia hacia machos en *Caiman latirostris* (Viotto et al., en revisión).

Para evaluar si los ácidos grasos 16:0 y 16:1 n-7 desempeñan un papel crítico en la determinación sexual, se podrían proponer como investigaciones futuras modificar la dieta de hembras mantenidas en semicautiverio mediante la suplementación con fuentes ricas en estos ácidos grasos y analizar si esto produce cambios en el porcentaje de crías hembras. Paralelamente, cuantificar estos ácidos grasos y los niveles de corticosterona tanto en sangre materna como en la yema de los huevos, con el fin de explorar posibles correlaciones entre dichas variables. Esto permitiría determinar si la inversión de estos ácidos grasos responde a la disponibilidad de alimentos en la naturaleza, particularmente en el contexto de fenómenos de sequías extremas que, como fue descrito en el Capítulo 2, coinciden con un aumento en la proporción de crías macho aún a temperaturas de incubación constantes de 32°C.

3.5.2. Variación de hormonas esteroides durante el PTS

En el yacaré overo los niveles de E₂ disminuyeron hasta 8 veces entre el estadio 19 y 21. Este patrón de disminución de E₂ durante el PTS fue reportado en *Alligator mississippiensis* y en especies de tortugas con DST como *Chelydra serpentina* y *Trachemys scripta* (Conley et al., 1997; Bowden et al., 2002; Elf et al., 2002; Paitz & Bowden, 2009). Tanto para *Caiman latirostris* como para *A. mississippiensis* la baja de E₂ coincide con la aparición de los primeros rasgos morfológicos de estructuras específicas de machos y hembras en las gónadas. Una posible explicación de este descenso es el metabolismo activo de los esteroides en la yema. En particular, el E₂ puede ser transformado en compuestos sulfonados, más solubles, que facilitan su transporte hacia el embrión y mantienen la capacidad de sesgar el sexo hacia hembras (Marroquín-Flores et al., 2022; Paitz & Bowden, 2009). Otra hipótesis es que esta disminución refleje un mecanismo regulador que evita una exposición excesiva del embrión a hormonas maternas. En este sentido, se ha propuesto en aves que parte de los esteroides se metabolizan a compuestos neuroactivos, que amortiguan los efectos maternos y contribuyen a modular el ambiente endocrino durante el desarrollo (Mouton & Duckworth, 2021).

En este estudio, la concentración de T se expresó como valor relativo, ya que los niveles originales estaban por debajo del límite de detección del ensayo. Para sortear esta limitación, se añadió un patrón conocido de T a las muestras y se normalizó dividiendo por el valor más bajo detectado. Aunque Conley et al. (1997) reportaron una disminución de T durante el PTS en *Alligator mississippiensis*, los resultados de la presente investigación indican un aumento relativo de T. Por otro lado, un patrón similar al de *A. mississippiensis* ocurre en la tortuga *Trachemys scripta*, donde los niveles de T disminuyeron durante el desarrollo embrionario y en este caso de forma dependiente con la temperatura de incubación (Paitz & Bowden, 2009). Esta tendencia podría reflejar no un incremento real en la cantidad de T en la yema, sino una disminución relativa de la cantidad total de

yema, lo que concentraría la concentración de T existente sin que se produzca un aumento neto de la hormona. También podría indicar una producción embrionaria temprana de T, ya que se conoce que la MCA tiene actividad hormonal en amniotas ovíparos (Cruze et al., 2013). Un patrón similar fue observado en la lagartija *Anolis carolinensis*, en el que los niveles de T aumentaron durante la maduración folicular y a medida que el huevo se desarrolla dentro del oviducto y también durante la incubación de los huevos (Lovern & Wade, 2001). Este patrón también se encontró para la corticosterona en lagartijas arbóreas (*Urosaurus ornatus*) (Jennings et al., 2001). En aves, por ejemplo, hay una caída de T y androstenediona durante los primeros días de desarrollo, pero no se debe a la absorción por parte del embrión si no a una transformación a otros metabolitos biológicamente inactivos o menos potentes (Kumar et al., 2019).

No obstante, estas diferencias deben interpretarse con cautela, dado que no se midieron concentraciones absolutas. Si bien este enfoque permitió superar el límite de detección del ensayo, y los resultados en cuanto a la inversión de T (Capítulo 1) concuerdan con los de Conley et al. (1997) en que no hay diferencias entre nidos para esta hormona; el método empleado aquí podría restringir la posibilidad de inferir cambios precisos en la dinámica de T durante el PTS.

El E₂, además de ser la hormona que muestra variación tanto entre nidos como dentro de ellos, disminuye durante el PTS coincidiendo con la aparición de los primeros rasgos morfológicos de diferenciación gonadal en *Caiman latirostris*. Aunque algunos estudios sugieren que las hormonas maternas presentes en la yema pueden metabolizarse hacia compuestos sin actividad esteroide (Mouton & Duckworth, 2021), los resultados obtenidos en el presente estudio acerca de la influencia no lineal del E₂ en el porcentaje de hembras de los nidos (Capítulo 1) y esta caída durante el PTS respaldan fuertemente el rol del E₂ en la determinación sexual de esta especie.

En contraste, la T no presenta variación dentro ni entre los nidos y, por el contrario, tiende a acumularse durante el PTS. En otras especies con DST, como la tortuga *Caretta caretta*, se ha demostrado que la relación E₂:T en la yema influye sobre la determinación sexual: cuando ambas hormonas se encuentran en concentraciones similares se producen machos, mientras que un desbalance hacia E₂ o T favorece la producción de hembras (Lockley et al., 2020). Sin embargo, los resultados presentados no apoyan la participación de la T en la determinación sexual de *Caiman latirostris*. Esto podría deberse a que, a diferencia de lo observado en tortugas, los niveles de T en cocodrilianos son más bajos (≈ 1 ng/g frente a ≈ 300 ng/g en tortugas) y no muestran variación entre nidos (Janzen et al., 1998). Lovern & Wade (2001) plantean dos hipótesis respecto a la función de T en la yema: (1) podría ser simplemente un subproducto no adaptativo de la fisiología reproductiva materna, aunque esto parece poco probable; o (2) podría influir en la morfología, la fisiología y el comportamiento de los juveniles y adultos. Asimismo, se ha propuesto que el embrión es capaz de modular su propio ambiente endocrino, de modo que la producción hormonal embrionaria también contribuiría al contenido hormonal de la yema (Jennings et al., 2001).

3.5.3 Expresión de genes relacionados con la determinación sexual durante el PTS

En cuanto a los genes involucrados en las redes génicas de masculinización no se encontraron diferencias para *amh* durante el PTS pero si para *sox9*. Es necesario recordar que en cocodrilianos *amh* precede la expresión de *sox9* durante el desarrollo embrionario (Western et al., 1999b). La expresión de *sox9* fue mayor al inicio del PTS y luego disminuyó manteniendo su expresión hasta el final del PTS. Canesini et al. (2023) evaluaron la expresión de este gen durante el desarrollo embrionario de *Caiman latirostris* a temperaturas productoras de machos y hembras durante los estadios 22, 24 y 27 en gónadas. En cuanto a *amh* estos autores no encontraron diferencias a temperaturas productoras de hembras, coincidiendo con los resultados de este estudio, pero si a temperaturas productoras de machos, donde los niveles de expresión del gen fueron mucho más altos. Aún así, los resultados obtenidos en el presente estudio fueron más bajos que los reportados a temperaturas de hembras por estos autores (Tabla 14). En *Alligator mississippiensis*, donde también cuantificaron la expresión de *amh* en GAM a temperaturas productoras de machos, la expresión fue mayor durante el estadio 23 en comparación con el estadio 19 de desarrollo (Urushitani et al., 2011). Además, en *A. mississippiensis* los niveles de expresión en el estadio 23 fueron mayores a los reportados en esta investigación.

En cuanto a *sox9*, al inicio del PTS los valores de expresión en el GAM fueron más altos en comparación con los otros estadios. Canesini et al. (2023) no encontraron diferencias para este gen a temperaturas productoras de hembras pero si a temperaturas productoras de machos donde fue mayor su expresión a partir del estadio 24 (Tabla 14). Esto coincide con lo reportado por Western et al. (1999a) para *sox9* donde reportaron que su expresión comienza a ser mayor luego de la diferenciación gonadal. Para *sox9*, en este trabajo los resultados fueron similares a los expresados a temperaturas productoras de hembras pero menores a la de las temperaturas productoras de machos en comparación con Canesini et al. (2023). En cambio, en el GAM de embriones de *Alligator mississippiensis* incubados a temperaturas productoras de machos, *sox9* no mostró diferencias durante el PTS (Urushitani et al., 2011).

Tabla 14: Expresión de genes *amh*, *sox9* y *cyp19a1* en el complejo gónada-adrenal-mesonefros (32°C) y en gónadas (31° y 33° C) de *Caiman latirostris* a diferentes temperaturas durante el periodo termosensible.

	Estadio 21-22			Estadio 24		
	30°C ¹	32°C	33°C ¹	30°C ¹	32°C	33°C ¹
<i>amh</i>	2,58 ± 0,53	0,35 ± 0,14	22,04 ± 3,92	1,650 ± 0,32	0,36 ± 0,20	291,5 ± 46,32
<i>sox9</i>	1,93 ± 0,09	1,06 ± 0,46	2,19 ± 0,34	1,50 ± 0,48	0,96 ± 0,66	10,52 ± 1,49
<i>cyp19a1</i>	0,046 ± 0,007	0,031 ± 0,026	0,0003 ± 6x10 ⁻⁵	0,012 ± 0,001	0,024 ± 0,014	0,0009 ± 4x10 ⁻⁵

Los datos de la expresión de genes a 30 y 33°C fueron obtenidos a partir del trabajo realizado por Canesini et al. (2023)¹.

En cuanto a *foxl2* hubo diferencias sólo entre los estadios 21 y 24, siendo coherente con su papel en el desarrollo ovárico. Los estudios que reportan la expresión de *foxl2* en embriones se realizaron en *Alligator mississippiensis*, en el que embriones incubados a temperaturas productoras de hembras registraron un aumento en la expresión del gen a partir del estadio 19 (Yatsu et al., 2016). Otros autores estudiaron la expresión de *foxl2* previa y posterior al PTS en GAM, identificando que la expresión temprana fue mayor en comparación con la tardía y cuando ya estaba determinado el sexo fue mayor para las hembras (Janes et al., 2013). Por su mayor expresión previa al PTS, plantean que *foxl2* podría estar implicado en alguna otra función además del desarrollo ovárico.

Para *cyp19a1*, la expresión fue mayor en el estadio 19 en comparación con los estadios 21 y 24. Canesini et al. (2023) informó que en el estadio 27, luego del PTS, la expresión fue superior respecto a los estadios 22 y 24 a temperaturas productoras de hembras, y que, a su vez, dicha expresión fue mayor que la observada a temperaturas productoras de machos en todos los estadios. Estos valores coinciden con los reportados por Gabriel et al. (2001), donde encuentran que la expresión de la aromatasa en GAM es mayor luego del PTS. Los resultados presentados en este estudio indican una mayor expresión en el estadio 19 y en los estadios 21 y 24 los niveles coinciden con lo reportado por Canesini et al. (2023). Sin embargo, en este estudio se observó una mayor variabilidad que podría deberse a que en este caso no se determinó el sexo de los embriones durante el PTS, lo que implica que las muestras podrían incluir individuos de ambos sexos, enmascarando así el patrón de expresión. Otro motivo podría ser que en este estudio, se obtuvo el GAM y no la gónada aislada completamente, lo que podría estar enmascarando patrones de expresión (Ramsey & Crews, 2007).

En los tres nidos analizados (Tabla 13), la expresión de *cyp19a1* no mostró diferencias en el estadio 19; sin embargo, en el estadio 21 sí se observó variación entre nidos, siendo mayor la expresión en aquel que presentó el menor porcentaje de hembras (nido 10). En cuanto a la inversión materna, no se detectaron diferencias en los niveles de E_2 ni de T entre nidos. No obstante, sí se encontraron diferencias en el porcentaje del ácido graso 16:0, el cual resultó más abundante en el nido con menor proporción de hembras. Este hallazgo es consistente con lo reportado en capítulos anteriores, donde el 16:0 también se asoció con nidos que produjeron menores porcentajes de hembras.

Los resultados de la expresión de genes relacionados con la DST en el GAM de embriones incubados a una temperatura constante de 32°C, son distintos a los observados en temperaturas productoras de machos (33°C) o hembras (31°C) y muestran la complejidad de la expresión génica cuando los embriones no son incubados a temperaturas productoras de ambos sexos. La ausencia de un pico de *amh* que preceda a *sox9* podría reflejar un desfase temporal en su expresión. La disminución de *sox9* coincide con la caída de los niveles de E_2 en la yema y con un aumento en la expresión de *foxl2*, coincidiendo con estudios que muestran que *foxl2* es un represor de *sox9* (Uhlenhaut et al., 2009). Comparado con lo reportado por Canesini et al. (2023), la expresión de *amh*

en los estadios 21 y 24 es menor que la observada a temperaturas de machos y hembras, mientras que los niveles de *sox9* hasta el estadio 21 son similares a los de machos y hembras, disminuyendo en el estadio 24 respecto a machos. Por otro lado, la expresión de *cyp19a1* es comparable a la observada en temperaturas productoras de hembras y la expresión es mayor en el estadio 19. En pollos la expresión de *cyp19a1* coincide con la de *foxl2* durante el desarrollo embrionario, aunque la inhibición de *cyp19a1* resulta en una reducción de la expresión de *foxl2* sugiriendo que el estrógeno podría producir una retroalimentación positiva sobre este último gen (Govoroun et al., 2004). Por lo tanto, la expresión de *cyp19a1* por sí sola no predice el sexo a 32 °C, coincidiendo con que su actividad aumenta principalmente después de la diferenciación sexual, siendo mayor en hembras que en machos, lo que sugiere que sería una consecuencia de la diferenciación sexual y no un determinante (Milnes et al., 2002; Smith et al., 1995).

En conjunto, estos resultados sugieren que, a temperaturas intermedias la determinación sexual podría estar regulada por la interacción de diferentes factores que modulan la expresión génica; a diferencia de lo que ocurre con las temperaturas productoras de machos y hembras donde la temperatura dirige la expresión de genes relacionados con la determinación sexual. También puede decirse que las redes regulatorias se mantienen, pero no las temporales. Dado que no se tiene registro del sexo de los embriones analizados, es probable que algunos se estén diferenciando hacia machos y otros hacia hembras, lo que también puede contribuir a los patrones observados.

Finalmente, no se pudo detectar la expresión de *srd5a1* mediante qPCR en gónadas de embriones, crías (machos y hembras) y de una hembra juvenil de *Caiman latirostris*. La correcta amplificación del gen de referencia *L8* descarta problemas en la calidad del ARN y la eficiencia de las reacciones. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la falta de detección se debe probablemente a una expresión específica por tejido, estadio y/o sexo de este gen. En humanos, la enzima 5 α -reductasa se expresa en gónadas y en tejidos periféricos, encontrándose dos isoformas: *srd5a1* y *srd5a2* (Robitaille & Langlois, 2020). *Srd5a2* se expresa fuertemente en tejidos masculinos, incluso en teleósteos como la anguila, su expresión es específica de los testículos. Por otro lado, para *srd5a1* se ha encontrado su expresión en ovarios y testículos (Yazawa et al., 2021). No hay estudios acerca de la expresión de *srd5a1* ni *srd5a2* en cocodrilianos pero ha sido informada su expresión durante el desarrollo embrionario en tortugas (Radhakrishnan et al., 2017; Schroeder & Rhen, 2019). En la tortuga *Chelydra serpentina* la expresión de *srd5a1* ha demostrado ser sensible a los tratamientos hormonales con DHT, aumentando su expresión luego del PTS en gónadas (Schroeder & Rhen, 2019).

Es factible que la expresión de *srd5a1* en gónadas esté restringida a un periodo de tiempo posterior a la evaluada en este estudio, como podría ser la adultez, o que su expresión esté ligada únicamente a machos juveniles o adultos. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la evolución diferencial de los genes asociados a la determinación y diferenciación sexual entre linajes.

En particular, se ha descrito que los genes de señalización hormonal, y *srd5a1* en especial, muestran tasas de evolución más rápidas en tortugas con respecto a otros reptiles. Esto podría explicar por qué en tortugas el gen se expresa durante el desarrollo gonadal embrionario, mientras que en *C. latirostris* su rol se habría desplazado hacia etapas más tardías o contextos sexuales específicos (Litterman et al., 2018). Por lo tanto, la ausencia de detección de *srd5a1* en los estadios tempranos del desarrollo de *Caiman latirostris* probablemente indican un desplazamiento temporal de su función. Futuros estudios deberían analizar la expresión de este gen, y de otras isoformas de la 5 α -reductasa, como *srd5a2*, en gónadas de machos juveniles y adultos. Esto sería esencial para confirmar esta hipótesis y comprender la evolución de las vías de desarrollo y mantenimiento de la función gonadal en cocodrilianos.

Capítulo 4: Discusión general y conclusiones

4.1. Discusión general

En esta tesis se evaluaron parámetros hormonales y energéticos de la yema de huevo de *Caiman latirostris* con el objetivo de comprender cómo los fenómenos climáticos previos a la oviposición influyen en la inversión materna y, a su vez, cómo dicha inversión materna puede incidir en la determinación sexual de la especie.

Se observó que los ácidos grasos de la yema se vieron afectados por las condiciones de semicautiverio, debido a diferencias en la dieta, mientras que las concentraciones de 17β -estradiol (E_2) y testosterona (T) no mostraron variaciones entre nidos de semicautiverio y de naturaleza. Estos resultados indican que, bajo las condiciones evaluadas, el semicautiverio afecta la inversión energética pero no la inversión hormonal de E_2 y T. Por lo tanto, no se recomienda incluir nidos de semicautiverio en estudios centrados en la inversión energética, mientras que su uso en estudios hormonales requeriría análisis adicionales, especialmente de manipulación dietaria, dado que en otras especies ovíparas la dieta puede modificar la concentración de esteroides en el huevo (Rutstein et al., 2005; Morosinotto et al., 2016).

Los hallazgos más relevantes sugieren que las condiciones climáticas afectan la inversión materna de ácidos grasos y de hormonas esteroides como la T en la yema de huevo de *Caiman latirostris*. Además, el fenómeno macroclimático de La Niña a lo largo de diferentes temporadas se asoció a un aumento de nacimientos de crías machos, aún cuando los nidos fueron incubados a una temperatura de 32°C (productora de ambos sexos). El E_2 fue la hormona esteroide presente en la yema de huevo que se asoció con el porcentaje de hembras de los nidos en *C. latirostris*, y no se vió afectada por las variables climáticas previas a la oviposición, por los fenómenos macroclimáticos ni por el lugar de estudio. En nidos con concentraciones altas y bajas de E_2 en la yema se produjo un mayor porcentaje de hembras en comparación con aquellos de concentraciones intermedias. Los nidos con mayores proporciones de ácidos grasos 16:0 y 16:1 n-7 estuvieron asociados a una menor producción de crías hembras, a menores precipitaciones y temperaturas medias más bajas en los meses previos a la oviposición.

Es importante destacar que el E_2 , a diferencia de lo que sucede con la T, no se ve influenciado por las variables climáticas, y como fue planteado en los capítulos anteriores las hembras podrían tener un control endógeno de su producción o esto sucedería por el hecho de que se reproducirían aquellas hembras que hayan pasado cierto umbral de condición corporal. Es importante destacar que el umbral mínimo de condición corporal necesario para que las hembras de *Caiman latirostris* inicien la reproducción no es un valor fijo, y no se encontró una relación directa con las variables climáticas. Además, una vez superado dicho umbral, la energía excedente se asocia con una mejora en la calidad de la inversión de la producción de huevos (Leiva et al., 2023). Futuros estudios deberían enfocarse en

evaluar la relación entre la condición corporal y buscar correlaciones entre los niveles hormonales en hembras reproductivas y los depositados en los huevos, además sería una valiosa información entender el papel (aún poco explorado) de la T en hembras reproductivas. En hembras reproductoras de *Alligator mississippiensis* ocurre un aumento de la T plasmática entre la vitelogénesis tardía y el inicio de las cópulas. Milnes & Moore (2024) plantea que la función de este aumento de T plasmática sería favorecer un comportamiento más territorial de las hembras para proteger sus nidos, como sucede en las aves cantoras (Gill et al., 2007). Estudios previos realizados en especies ovíparas han demostrado que la deposición de hormonas esteroides maternas puede verse afectada por la dieta (Rutstein et al., 2005; Morosinotto et al., 2016) y las temperaturas previas a la postura (Lessells et al., 2016). Lessells et al. (2016) estudiaron la inversión materna-hormonal en el carbonero común (*Parus major*) y encontraron que los niveles depositados de 5 α -dihidrotestosterona (DHT) y de corticosterona depositados en la yema se correlacionaron negativamente con las temperaturas medias ambientales previas a la oviposición, pero ni E₂ ni T mostraron asociaciones con las temperaturas.

Por otro lado, dado que el fenómeno macroclimático de La Niña se asoció con un mayor porcentaje de crías machos, incluso cuando los huevos fueron incubados a 32 °C (y que este patrón no se reflejó en un aumento de las concentraciones de E₂, las cuales permanecieron constantes a lo largo de las temporadas), es posible que otros componentes maternos de la yema estén desempeñando un papel relevante en la determinación sexual. Uno de estos componentes involucrados podría ser la corticosterona, si bien no hay datos de concentraciones basales de corticosterona en yema de huevo para la especie *Caiman latirostris* estudios realizados por Viotto et al. (en revisión), donde administran corticosterona exógena a los huevos, mostraron un sesgo sexual hacia machos. En reptiles la corticosterona es el principal glucocorticoide (GC) liberado en respuesta al estrés (Cockrem 2013; Parachú-Marcó et al., 2017) y tiene el potencial de sesgar el sexo de la descendencia de forma especie específica (Warner et al., 2009). Por lo tanto, la ocurrencia de sequías en años consecutivos, que conducen a la disminución de la disponibilidad de alimento y a la reducción de los cuerpos de agua, podría generar un mayor nivel de estrés en las hembras y favorecer la deposición de concentraciones más elevadas de corticosterona en los huevos. Futuros trabajos podrían analizar las concentraciones fisiológicas de corticosterona en la yema de huevo y si esta hormona se ve afectada por las condiciones climáticas, fenómenos macroclimáticos y microclimáticos de cada lugar en *C. latirostris*.

En cuanto a la yema de huevo, los mayores porcentajes de los ácidos grasos 16:0 y 16:1 n-7 se asociaron a nidos con menores porcentajes de hembras. Se proponen dos mecanismos no excluyentes que podrían explicar esta relación. En primer lugar, los ácidos grasos funcionan como ligandos de los Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPAR) que son factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de genes y del metabolismo lipídico (Yoon, 2009). En el pez medaka (*Oryzias latipes*) el cortisol (principal GC en peces) aumenta la expresión de *ppara* en las gónadas de embriones induciendo la masculinización y lo haría regulando la expresión de la

aromatasa (Hara et al., 2020). En segundo lugar, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* los niveles de ácidos grasos estuvieron involucrados en la determinación sexual, donde la disponibilidad de nutrientes fue una señal para dirigir el desarrollo gonadal (Tang & Han, 2017). En medaka se han realizado estudios de inanición y se ha medido la expresión de genes relacionados con la determinación sexual en embriones, lo que causó una disminución en la expresión de genes relacionados con la diferenciación femenina, como *foxl2* y *cyp19a1*, y aumentó la expresión de *dmrt1* que está relacionado con la diferenciación masculina (Sakae & Tanaka, 2021). En el pez cebra (*Danio rerio*), también se produjeron mayores cantidades de machos en tratamientos con bajo contenido de alimentos (Lawrence et al., 2008). En este contexto, 16:0 y 16:1 n-7 podrían funcionar como ligandos que activan PPAR e influir en la determinación sexual, o bien ser indicadores de épocas de baja disponibilidad alimentaria, en las cuales se favorece la producción de machos. Ambas posibilidades no son mutuamente excluyentes y requerirían estudios experimentales para corroborarlas.

En cuanto a la expresión de genes relacionados con la determinación sexual de embriones incubados a 32°C en el complejo gónada-adrenal-mesonefros (GAM) de *Caiman latirostris*, las redes génicas se mantuvieron conservadas, aunque los niveles de expresión diferían respecto de los registrados a 31 °C y 33 °C. Además, la expresión de *cyp19a1* por sí sola no predijo el sexo de los nidos a 32 °C, en cambio, su incremento parece reflejar un proceso de diferenciación ya iniciado hacia la vía femenina, tal como ha sido planteado en estudios previos (Milnes et al., 2002; Smith et al., 1995).

La concentración de E₂ en la yema de huevo, como se mencionó previamente, constituye uno de los predictores del sexo en los nidos. En concordancia con ello, observamos una disminución de su concentración en el periodo termosensible (PTS) entre los estadios 19 y 21. Retomando la pregunta planteada en la discusión del Capítulo 1 acerca de cómo las bajas y altas concentraciones de E₂ depositadas por la hembra en la yema de los huevos de *Caiman latirostris* generan mayores porcentajes de crías hembras en los nidos, y considerando los resultados obtenidos en el Capítulo 3 acerca de la expresión de genes, se propone lo siguiente:

- Bajas concentraciones de E₂ en la yema tendrían el potencial de inducir un aumento en la abundancia del receptor de estrógenos α (ESR1) durante el PTS. Este incremento en la disponibilidad del receptor funcionaría como un mecanismo de compensación para maximizar la captación de la baja concentración hormonal. Como han demostrado Han et al. (2025), a bajas concentraciones de E₂, el ESR1 se une predominantemente a sitios en la cromatina que carecen de un motivo canónico de unión para estrógenos. Esta unión, además, requeriría de una cooperación con otros factores de transcripción (Han et al., 2025), lo que permitiría que ESR1 se una a sitios alternativos en el ADN. Como consecuencia, podría activarse una

transcripción alternativa de genes (distinta a la activada por altas concentraciones de E_2) que conduciría a una regulación positiva de genes clave para la diferenciación ovárica (Fig. 33 A).

- A concentraciones intermedias de E_2 , el sistema entraría en una zona de conflicto, ya que los niveles de E_2 podrían ser insuficientes para saturar los receptores, pero tampoco inducirían mecanismos de compensación. Esto podría hacer que la gónada siga trayectorias distintas produciendo tanto hembras como machos. Como fue descrito previamente en los resultados, si bien la variabilidad en las concentraciones de E_2 entre nidos es mayor que la observada dentro de un mismo nido, serían precisamente estas diferencias intranidada las que resultan críticas para determinar el destino sexual de los embriones en concentraciones intermedias de E_2 . Por lo tanto, mínimas diferencias en los niveles hormonales, posiblemente combinadas con otros factores como la expresión de receptores o factores de transcripción, podrían ser los determinantes en la producción de crías de ambos sexos dentro de un mismo nido.
- Las altas concentraciones de E_2 en la yema, provocarían una saturación de los ESR1, lo que provocaría la unión a sitios canónicos (sitios de respuesta a estrógenos) de alta afinidad. Esto desencadenaría la transcripción de genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual femenina. Este mecanismo de feminización, inducido por altas concentraciones de E_2 en la yema es consistente con lo observado en tratamientos realizados con concentraciones suprafisiológicas de E_2 , los cuales inducen la feminización, incluso a temperaturas productoras de machos (Canesini et al., 2018; Wang et al., 2025; Fig. 33 B).

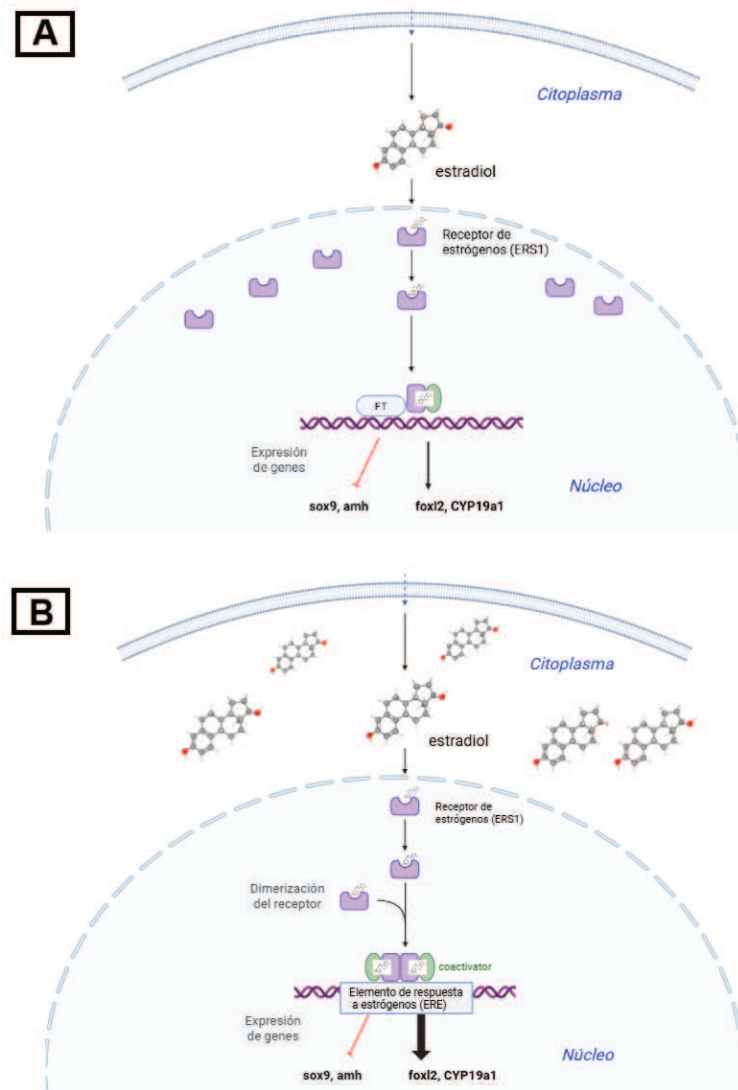


Figura 33: Hipótesis sobre el efecto de las concentraciones de estradiol (E_2) en la robustez de la expresión de genes de determinación sexual por temperatura (DST), donde el fenotipo resultante (hembra) es el mismo en ambos casos. A) Bajas concentraciones de E_2 promueven la acumulación nuclear del receptor de estrógeno α (ERS1). Tras su unión con E_2 , el complejo resultante interactúa de manera cooperativa con factores de transcripción (FT) previamente unidos a sitios no canónicos en el ADN. Esta unión facilita la activación de programas transcripcionales alternativos que inducen el desarrollo del fenotipo femenino mediante una expresión génica moderada. B) Altas concentraciones de E_2 saturan los receptores ESR1, favoreciendo su dimerización y la formación de complejos canónicos. Estos dímeros se unen con alta afinidad a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en regiones reguladoras del ADN, desencadenando una expresión génica robusta y sostenida de los genes responsables de la determinación femenina, resultando en una activación transcripcional más potente que la observada a bajas concentraciones de E_2 .

La observación de que tanto concentraciones fisiológicas bajas como altas de E_2 en la yema inducen el desarrollo de hembras en el yacaré overo coincide con lo reportado en ensayos

toxicológicos, donde a menudo se describe una relación dosis-respuesta no monotónica, con forma de U. Este tipo de respuestas es común en estudios realizados empleando hormonas naturales y disruptores endocrinos, y se ha propuesto que los receptores nucleares podrían ser uno de los principales mecanismos involucrados (Vandenberg et al., 2012).

Canesini et al. (2018) estudiaron la expresión del gen que codifica para el receptor de estrógeno α (*Esr1*) en gónadas de embriones de *Caiman latirostris* y observaron que, durante la diferenciación gonadal (estadio 22), las hembras expuestas a E_2 presentaron una mayor expresión de *Esr1* que las hembras obtenidas por DST. Aunque en estadios posteriores al PTS, su expresión fue menor que en hembras producidas por temperaturas feminizantes. Estos resultados sugieren que, a temperaturas productoras de hembras, las redes génicas responsables de la determinación sexual podrían activarse mediante mecanismos distintos de los *Esr1*. En cambio, cuando se elimina el efecto de la temperatura sobre la determinación sexual, el E_2 actuaría uniéndose a los *Esr1* para activar genes diana clave involucrados en la diferenciación ovárica, favoreciendo que la gónada bipotencial se desarrolle como ovario (Wang et al., 2025).

Los resultados del presente trabajo aportan evidencia novedosa sobre el funcionamiento del sistema de determinación sexual dependiente de la temperatura (DST) en *Caiman latirostris*. En primer lugar, se demuestra que el E_2 materno es un modulador del destino sexual, cuya relación con el sexo no es lineal, sino cuadrática, revelando un patrón complejo no descrito previamente para la especie. En segundo lugar, se identifican componentes energéticos de la yema (16:0 y 16:1 n-7) asociados a una mayor proporción de machos. Finalmente, se evidencia que fenómenos macroclimáticos como La Niña pueden influir indirectamente en la proporción de sexos incluso bajo condiciones de incubación controladas, actuando a través de su efecto sobre la inversión materna. En conjunto, estos resultados muestran que la DST en *C. latirostris* no depende únicamente de la temperatura, sino que de la interacción entre señales maternas (que se refleja en la composición bioquímica del huevo) y condiciones ambientales. Además proponemos que el sexo no está determinado por un único factor, si no por varios y proporcionamos otros posibles candidatos. Entre ellos, se destacan candidatos como la corticosterona, la activación de PPAR y el estado nutricional materno, los cuales podrían interactuar con el E_2 para modificar la expresión génica y orientar el desarrollo hacia fenotipos sexuales masculinos o femeninos.

4.2. Conclusiones finales

Este estudio tuvo como objetivo investigar como las hormonas esteroides, ácidos grasos y las variables climáticas previas a la oviposición influyen sobre la determinación sexual del yacaré overo. A continuación se enumeran las conclusiones finales a las cuales se pudo arribar a partir de este estudio.

- En condiciones de semicautiverio, al igual que en la naturaleza, la dieta materna determina principalmente el perfil de ácidos grasos de la yema. Por lo que no se recomienda incluir nidos provenientes de semicautiverio en estudios sobre efectos climáticos en la inversión materna de ácidos grasos.
- La concentración de estradiol (E_2) en la yema de huevo de yacaré overo difiere tanto dentro como entre los nidos, mientras que la inversión de testosterona (T) es más conservada, ya que no se encontraron diferencias ni entre ni dentro de los nidos.
- La inversión de E_2 influye de manera no lineal en la determinación sexual de *Caiman latirostris*: altas y bajas concentraciones se asocian con un mayor porcentaje de hembras, mientras que la T no parece afectar la determinación sexual.
- Nidos con mayores porcentajes de ácido palmítico (16:0) y ácido palmitoleico (16:1 n-7) en yema presentaron menores porcentajes de hembras, sugiriendo un posible papel de estos ácidos grasos en la determinación sexual por temperatura.
- No se observó relación entre las hormonas esteroides (E_2 y T) y los ácidos grasos depositados en la yema, lo que podría indicar que la inversión de estos componentes podría estar regulada por mecanismos independientes.
- Las condiciones climáticas previas a la oviposición influyeron sobre el porcentaje de hembras y la inversión de ácidos grasos y T. Mayores temperaturas medias en septiembre y octubre se asociaron con un mayor porcentaje de hembras y menores niveles de 16:0. Por otro lado, temperaturas medias elevadas y mayores precipitaciones acumuladas se vincularon con un aumento de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) relevantes para el desarrollo embrionario, como ácido araquidónico (20:4 n-6), ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3) y ácido docosahexaenoico (22:6 n-3).
- Fenómenos climáticos extremos, como las sequías producidas por el fenómeno climático “La Niña”, podrían sesgar la proporción sexual de la descendencia hacia machos. Esto se evidencia en la disminución del porcentaje de hembras en temporadas recientes, replicando en incubación controlada patrones similares a los observados en nidos naturales. Esto sugiere que, más allá de la temperatura, existe un efecto materno previo a la oviposición que modula la determinación sexual.
- Durante el desarrollo embrionario, el E_2 disminuye entre el inicio y la mitad del período termosensible (PTS), mientras que la T aumenta hacia la mitad del PTS en comparación con los primeros estadios, respaldando el papel del E_2 en la determinación sexual. No se observaron cambios en el perfil de ácidos grasos general durante el PTS, aunque podrían ocurrir variaciones en su cantidad absoluta en la yema.
- Los genes asociados con la determinación sexual en el complejo gónada-adrenal-mesonefros (GAM) muestran diferencias en nivel y temporalidad de expresión a 32 °C (temperatura que

produce individuos de ambos sexos) en comparación con temperaturas productoras de machos y hembras. La expresión de *cyp19a1* por sí sola no predice el sexo embrionario.

- No se detectó expresión de *srd5a1*, sugiriendo que su función podría estar restringida sólo a animales machos y a etapas más avanzadas del desarrollo, como la adultez.

Como perspectivas futuras se mencionan posibles líneas de investigación que podrían complementar los resultados de este trabajo:

- Estudiar cómo regula la hembra la inversión de E₂ en la yema, y si la inversión de E₂ y T está relacionada con la condición corporal o fisiológica de las hembras.
- Analizar la relación entre las concentraciones fisiológicas de E₂ y la expresión de receptores de estrógenos (RE) en las gónadas del yacaré overo durante el desarrollo embrionario.
- Determinar las implicancias de los ácidos grasos 16:0 y 16:1 n-7 en la determinación sexual, o si su variación refleja únicamente la inversión materna, condicionada por los recursos alimenticios disponibles para las hembras durante temporadas con condiciones climáticas extremas, en las cuales se registra una mayor proporción de machos.
- Identificar otros componentes maternos que podrían influir en la determinación sexual a temperaturas no determinantes del sexo.
- Caracterizar la inversión materna de corticosterona en la yema de huevo de *Caiman latirostris* y estudiar si influye en la determinación sexual.
- Estudiar la expresión de *srd5a1* en otros periodos de desarrollo, como en caimanes machos juveniles o adultos, para esclarecer su papel biológico. También la expresión de otras isoformas de la enzima, como la *srd5a2* para tratar de identificar algún posible rol en la determinación sexual.

Bibliografía

Achermann, J. C., Ito, M., Ito, M., Hindmarsh, P. C., & Jameson, J. L. (1999). A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nature Genetics*, 22, 125–126. <https://doi.org/10.1038/9629>

Al Bayati, A. A. S. Y. (2024). The Impact of Climate Change on Biodiversity and Ecosystem Functioning. *Academic International Journal of Pure Science (AIJPS)*, 2(2), 15-25.

Alshehab, E. A. (2024). Confirming the Impact of Climate Change on Biodiversity: Results from a Global Survey. *bioRxiv*, 2024-11.

Anand, A., Patel, M., Lalremruata, A., Singh, A. P., Agrawal, R., Singh, L., & Aggarwal, R. K. (2008). Multiple alternative splicing of Dmrt1 during gonadogenesis in Indian mugger, a species exhibiting temperature dependent sex determination. *Gene*, 425, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.08.005>

Arnold, W., Giroud, S., Valencak, T. G., & Ruf, T. (2015). Ecophysiology of omega fatty acids: a lid for every jar. *Physiology*, 30(3), 232-240. <https://doi.org/10.1152/physiol.00047.2014>

Arneth, B. (2025). Endocrine parameters and climate change. *Endocrines*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.3390/endocrines6010005>

Baddela, V. S., Sharma, A., & Vanselow, J. (2020). Non-esterified fatty acids in the ovary: friends or foes?. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 60.

Bao, H. S., Cai, H., Han, W., Zhang, H. Y., Sun, W., Ge, C. T., & Qian, G. Y. (2017). Functional characterization of Cyp19a1 in female sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis*. *Scientia Sinica Vitae*, 47(6), 640-649. <https://doi.org/10.1360/N052017-00051>

Beato, M. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, 6(3), 225–236. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.225>

Bebbington, K., & Groothuis, T. (2021). Who listens to mother? A wholefamily perspective on the evolution of maternal hormone allocation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 96, 1951–1968. <https://doi.org/10.1111/brv.12733>

Bianchi, A. R., & Cravero, S. A. C. (2010). *Atlas climático digital de la República Argentina*. Ediciones INTA; Estación Experimental Agropecuaria Salta.

- Blackburn, D. G. (2021). Functional morphology, diversity, and evolution of yolk processing specializations in embryonic reptiles and birds. *Journal of Morphology*, 282(7), 995-1014. <https://doi.org/10.1002/jmor.21267>
- Bock, S. L., Lowers, R. H., Rainwater, T. R., Stolen, E., Drake, J. M., Wilkinson, P. M., ... & Parrott, B. B. (2020). Spatial and temporal variation in nest temperatures forecasts sex ratio skews in a crocodilian with environmental sex determination. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1926), 20200210. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0210>
- Bock, S. L., Loera, Y., Johnson, J. M., Smaga, C. R., Haskins, D. L., Tuberville, T. D., ... & Parrott, B. B. (2023). Differential early-life survival underlies the adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a long-lived reptile. *Functional Ecology*, 37(11), 2895-2909. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14420>
- Bogart, M. H. (1987). Sex determination: a hypothesis based on steroid ratios. *Journal of theoretical biology*, 128(3), 349-357. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(87\)80077-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(87)80077-2)
- Boggs, A. S., Botteri, N. L., Hamlin, H. J., & Guillette Jr, L. J. (2011). Endocrine disruption of reproduction in reptiles. In *Hormones and reproduction of vertebrates* (pp. 373-396). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374930-7.10014-7>
- Bonach, K., Malvasio, A., Matushima, E. R., & Verdade, L. M. (2011). Temperature-sex determination in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). *Iheringia. Série Zoologia*, 101, 151–155. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212011000200001>
- Bonomo, A. V., & Uauy, R. (2005). Funciones biológicas y metabolismo de los ácidos grasos esenciales y de sus derivados activos. *Tratado de nutrición* (pp. 429-450). Acción médica.
- Bowden, R. M., Ewert, M. A., & Nelson, C. E. (2000). Environmental sex determination in a reptile varies seasonally and with yolk hormones. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1454), 1745–1749. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1205>
- Bowden, R. M., Ewert, M. A., & Nelson, C. E. (2002). Hormone levels in yolk decline throughout development in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*). *General and comparative endocrinology*, 129(3), 171-177.
- Bowden, R. M., & Paitz, R. T. (2018). Temperature fluctuations and maternal estrogens as critical factors for understanding temperature dependent sex determination in nature. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329(4–5), 177–184. <https://doi.org/10.1002/jez.2183>

Bowden, R. M., & Paitz, R. T. (2021). Is thermal responsiveness affected by maternal estrogens in species with temperature-dependent sex determination? *Sexual Development*, 15(1–3), 69–79. <https://doi.org/10.1159/000515187>

Boyen, J., Rodríguez, M. T., Vlaeminck, B., Fink, P., Hablützel, P. I., & De Troch, M. (2024). Temperature, pH, and diet interactively affect biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in a benthic harpacticoid copepod. *Limnology and Oceanography*, 70(2), 334–348. <https://doi.org/10.1002/lno.12763>

Brandt, L. A., Beauchamp, J. S., Jeffery, B. M., Cherkiss, M. S., Mazzotti, F. J. (2016). Fluctuating water depths affect American alligator (*Alligator mississippiensis*) body condition in the Everglades, Florida, USA. *Ecological indicators*, 67, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.003>

Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs*, 27(4), 326–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>

Brooks, M. E., Kristensen, K., Van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., ... & Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling.

Bull, J. J., & Vogt, R. C. (1979). Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science*, 206(4423), 1186–1188. <https://doi.org/10.1126/science.505003>

Bull, J. J., Vogt, R. C., & Bulmer, M. G. (1982). Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. *Evolution*, 36(2), 333–341. <https://doi.org/10.2307/2408052>

Bull, J. J., Gutzke, W. H. N., & Crews, D. (1988). Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. *General and Comparative Endocrinology*, 70(3), 425–428. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(88\)90117-7](https://doi.org/10.1016/0016-6480(88)90117-7)

Burchfield, J. S., Li, Q., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2015). JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 67, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.006>

Cabezas-Zábala, C.C., Hernández-Torres, B.C., Vargas-Zarate, M. (2016). Aceites y grasas: efectos en la salud y regulación mundial. *Revista de La Facultad de Medicina*, 64(4), 761. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v64n4.53684>

Cáceres, M. D., & Legendre, P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*, 90(12), 3566–3574. <https://doi.org/10.1890/08-1823.1>

Calderini, M. L., Pääkkönen, S., Salmi, P., Peltomaa, E., & Taipale, S. J. (2023). Temperature, phosphorus and species composition will all influence phytoplankton production and content of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Plankton Research*, 45(4), 625-635.

Campbell, H. A., Dwyer, R. G., Gordos, M., & Franklin, C. E. (2010). Diving through the thermal window: implications for a warming world. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1701), 3837-3844. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0902>

Campos, Z., Coutinho, M., Mourão, G., Bayliss, P., & Magnusson, W. E. (2006). Long distance movements by *Caiman crocodilus yacare*: implications for management of the species in the Brazilian Pantanal. *The Herpetological Journal*, 16(2), 123-132.

Canesini, G., Stoker, C., Galoppo, G. H., Durando, M. L., Tschopp, M. V., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M. M., & Ramos, J. G. (2018). Temperature-vs. estrogen-induced sex determination in *Caiman latirostris* embryos: Both females, but with different expression patterns of key molecules involved in ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*, 259, 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.11.024>

Canesini, G., Galoppo, G. H., Tavalieri, Y. E., Lazzarino, G. P., Stoker, C., Luque, E. H., ... & Muñoz-de-Toro, M. (2023). Disruption of the developmental programming of the gonad of the broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) after in ovo exposure to atrazine. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(14), 40132-40146. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-25104-z>

Carsia, R. V., McIlroy, P. J., Cox, R. M., Barrett, M., & John-Alder, H. B. (2012). Effects of food restriction on steroidogenesis in dispersed adrenocortical cells from Yarrow's Spiny Lizard (*Sceloporus jarrovi*). *General and Comparative Endocrinology*, 178(2), 306-313. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.06.002>

Carter, A. W., Bowden, R. M., & Paitz, R. T. (2018). Evidence of embryonic regulation of maternally derived yolk corticosterone. *Journal of Experimental Biology*, 221(22), jeb182600. <https://doi.org/10.1242/jeb.182600>

Cherkiss, M. S., Watling, J. I., Brandt, L. A., Mazzotti, F. J., Lindsay, J., Beauchamp, J. S., ... & Hart, K. M. (2020). Shifts in hatching date of American crocodile (*Crocodylus acutus*) in southern Florida. *Journal of Thermal Biology*, 88, 102521. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102521>

Chung, B. H., Mitchell, S. H., Zhang, J. S., & Young, C. Y. (2001). Effects of docosaheptaenoic acid and eicosapentaenoic acid on androgen-mediated cell growth and gene expression in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 22(8), 1201-1206.

- Cikos, Š., Bukovská, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC molecular biology*, 8(1), 113.
- Coe, M., Webb, G. J. W., Manolis, S. C., & Whitehead, P. J. (1988). Wildlife management: crocodiles and alligators. *Journal of Applied Ecology*, 25(2), 758. <https://doi.org/10.2307/2403875>
- Cole, T. J., Short, K. L., & Hooper, S. B. (2019). The science of steroids. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 24(3), 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.05.005>
- Conley, A. J., Elf, P., Corbin, C. J., Dubowsky, S., Fivizzani, A., & Lang, J. W. (1997). Yolk steroids decline during sexual differentiation in the alligator. *General and Comparative Endocrinology*, 107(2), 191–200. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6913>
- Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in male physiology. *Physiological Reviews*, 97(3), 995–1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>
- Crain, D. A., Guillette, L. J., Jr., Rooney, A. A., & Pickford, D. B. (1997). Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environmental Health Perspectives*, 105(5), 528–533. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105528>
- Cree, A., Thompson, M. B., & Daugherty, C. H. (1995). Tuatara sex determination. *Nature*, 375(6532), 543. <https://doi.org/10.1038/375543a0>
- Crews, D., Bull, J. J., & Wibbels, T. (1991). Estrogen and sex reversal in turtles: a dose-dependent phenomenon. *General and comparative endocrinology*, 81(3), 357-364. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(91\)90162-Y](https://doi.org/10.1016/0016-6480(91)90162-Y)
- Crews, D., & Wibbels, T. (1993). U.S. patent No. 5,201,280. U.S. patent and trademark office.
- Crews, D., & Bergeron, J. M. (1994). Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *The Journal of Endocrinology*, 143(2), 279–289. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1430279>
- Cockrem, J. F. (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and comparative endocrinology*, 181, 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.025>
- Cruze, L., Hamlin, H. J., Kohno, S., McCoy, M. W., & Guillette Jr, L. J. (2013). Evidence of steroid hormone activity in the chorioallantoic membrane of a Turtle (*Pseudemys nelsoni*). *General and Comparative Endocrinology*, 186, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.007>

de la Casa, A. C., & Ovando, G. G. (2006). Influencia de episodios El Niño-Oscilación Sur (ENOS) sobre la precipitación y el rendimiento de maíz en la provincia de Córdoba, Argentina. *Agricultura técnica*, 66(1), 80-89.

Denyer, G. S. (2002). Essential role of fats throughout the lifecycle. Background: the renaissance of fat: roles in membrane structure, signal transduction and gene expression. *The Medical Journal of Australia*, 176(S11), S109-10.

Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C., & Martin, P. R. (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6668-6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>

Doheny, B. M., Kohno, S., Parrott, B. B., & Guillette Jr, L. J. (2016). In ovo treatment with an estrogen receptor alpha selective agonist causes precocious development of the female reproductive tract of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 238, 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02.026>

Du, W. G., Li, S. R., Sun, B. J., & Shine, R. (2023). Can nesting behaviour allow reptiles to adapt to climate change?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 378(1884), 20220153. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0153>

Durando, M., Cocito, L., Rodríguez, H. A., Varayoud, J., Ramos, J. G., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2013). Neonatal expression of amh, sox9 and sf-1 mRNA in Caiman latirostris and effects of in ovo exposure to endocrine disrupting chemicals. *General and Comparative Endocrinology*, 191, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.013>

Echeverría, F., Ortiz, M., Valenzuela, R., & Videla, L. A. (2016). Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 114, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.10.001>

Eising, C. M., Müller, W., & Groothuis, T. G. (2006). Avian mothers create different phenotypes by hormone deposition in their eggs. *Biology letters*, 2(1), 20-22. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0391>

Elf, P. K., Lang, J. W., & Fivizzani, A. J. (2002). Yolk hormone levels in the eggs of snapping turtles and painted turtles. *General and Comparative Endocrinology*, 127(1), 26-33. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00017-5](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00017-5)

Elf, P. K. (2003). Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *General and Comparative Endocrinology*, 132(3), 349-355. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00098-4)

Elf, P. K. (2004). Yolk steroid hormones and their possible roles in TSD species. In N. Valenzuela & V. A. Lance (Eds.), *Temperature-dependent sex determination in vertebrates* (pp. 111–118). Smithsonian Books.

Enríquez, L., González-Quijano, A., Ollero, R., Iglesias, M., Criado, M. R., & Matas, P. (2003). Ácidos grasos trans y nutrición. *Endocrinología y Nutrición*, 50(8), 317-323. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(03\)74545-8](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(03)74545-8)

Ewert, M. A., & Nelson, C. E. (1991). Sex determination in turtles: Diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia*, 1991, 50–69. <https://doi.org/10.2307/1446248>

Ewert, M. A., Jackson, D. R., & Nelson, C. E. (1994). Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. *Journal of Experimental Zoology*, 270(1), 3–15. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700103>

De Carvalho, C. C., & Caramujo, M. J. (2018). The various roles of fatty acids. *Molecules*, 23(10), 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>

Dorizzi, M., Richard-Mercier, N., Desvages, G., Girondot, M., & Pieau, C. (1994). Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 58(1), 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1994.5810001.x>

Escamilla-Rosales, M. F., Ariza-Ortega, J. A., Ramos-Cassellis, M. E., Castañeda-Antonio, D., Romo-Gómez, C., Díaz-Reyes, J., ... & Olivo-Ramírez, D. P. (2019). Comparison of the proximal chemical and fatty acid composition of the fried grasshopper's (Orthoptera) dish. *European Food Research and Technology*, 245, 1629-1640. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03272-6>

Fan, Z., Zou, Y., Jiao, S., Tan, X., Wu, Z., Liang, D., Zhang, P., & You, F. (2017). Significant association of cyp19a promoter methylation with environmental factors and gonadal differentiation in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 208, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.02.017>

Ferguson, M. W., & Joanen, T. (1982). Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. *Nature*, 296(5860), 850–853. <https://doi.org/10.1038/296850a0>

Ferguson, M. W., & Joanen, T. (1983). Temperature-dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*. *Journal of Zoology*, 200(2), 143–177. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1983.tb05781.x>

- Fox, J., & Weisberg, S. (2018). *An R companion to applied regression*. Sage publications.
- Fuiman, L. A. (2018). Egg boon fatty acids reveal effects of a climatic event on a marine food web. *Ecological Monographs*, 88(4), 585-599. <https://doi.org/10.1002/ecm.1324>
- Fukuda, Y., McDonald, P. J., & Crase, B. (2022). Lost to the sea: predicted climate change threats to saltwater crocodile nesting habitat. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 839423. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.839423>
- Gabriel, W. N., Blumberg, B., Sutton, S., Place, A. R., & Lance, V. A. (2001). Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures. *Journal of Experimental Zoology*, 290(5), 439-448. <https://doi.org/10.1002/jez.1087>
- Gagliano, M., & McCormick, M. I. (2009). Hormonally mediated maternal effects shape offspring survival potential in stressful environments. *Oecologia*, 160, 657-665. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1335-8>
- Ge, C., Ye, J., Zhang, H., Zhang, Y., Sun, W., Sang, Y., Capel, B., & Qian, G. (2017). Dmrt1 induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. *Development*, 144(12), 2222–2233. <https://doi.org/10.1242/dev.152033>
- Ge, C., Ye, J., Weber, C., Sun, W., Zhang, H., Zhou, Y., Cai, C., Qian, G., & Capel, B. (2018). The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species. *Science*, 360(6389), 645–648. <https://doi.org/10.1126/science.aap8328>
- Gees, M., Owsianik, G., Nilius, B., & Voets, T. (2011). TRP channels. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 563–608. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110026>
- Gill, S. A., Alfson, E. D., & Hau, M. (2007). Context matters: female aggression and testosterone in a year-round territorial neotropical songbird (*Thryothorus leucotis*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1622), 2187-2194. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0457>
- Goldson, S. L., Emberson, R. M., & Bickerstaffe, R. (1981). Seasonal changes in the fatty acid composition of Argentine stem weevil, *Hyperodes bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 8(1), 79-82. <https://doi.org/10.1080/03014223.1981.10427943>
- González, G. A. (2010). Caracterización del Hábitat y Composición de la Dieta del Babo Morichalero (*Paleosuchus palpebrosus*) en los Llanos Orientales, Estado Anzoátegui. Tesis de Grado. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

González, E. J., Martínez-Lopez, M., Morales-Garduza, M. A., García- Morales, R., Charruau, P., & Gallardo-Cruz, J. A. (2019). The sex determination pattern in crocodilians: A systematic review of three decades of research. *Journal of Animal Ecology*, 88(9), 1417–1427. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13037>

Govoroun, M. S., Pannetier, M., Pailhoux, E., Cocquet, J., Brillard, J. P., Couty, I., ... & Cotinot, C. (2004). Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Developmental dynamics: An official publication of the American Association of Anatomists*, 231(4), 859-870.

Grigg, G., & Kirshner, D. (2015). Biology and evolution of crocodylians. . CSIRO Publishing, Clayton.

Gromadzka-Ostrowska, J. (2006). Effects of dietary fat on androgen secretion and metabolism. *Reproductive Biology*, 6, 13-20.

Guibert, F., Richard-Yris, M. A., Lumineau, S., Kotrschal, K., Guémené, D., Bertin, A., ... & Houdelier, C. (2010). Social instability in laying quail: consequences on yolk steroids and offspring's phenotype. *Plos one*, 5(11), e14069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014069>

Guillette Jr, L. J., Cree, A., & Rooney, A. A. (1995). Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In *Health and welfare of captive reptiles* (pp. 32-81). Dordrecht: Springer Netherlands.

Guillette Jr, L. J., Woodward, A. R., Crain, D. A., Masson, G. R., Palmer, B. D., Cox, M. C., ... & Orlando, E. F. (1997). The reproductive cycle of the female American alligator (*Alligator mississippiensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 108(1), 87-101. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6953>

Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. *FEBS letters*, 580(23), 5477-5483. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.066>

Haeussner, E. L., VanderMeer, R., & Cardeilhac, P. T. (1996). Effects of alligator egg yolk long-chain fatty acids on growth performance of hatchlings. In *International Association For Aquatic Animal Medicine* (pp. 77-82); USDA: Washington, DC, USA.

Hallett, T. B., Coulson, T., Pilkington, J. G., Clutton-Brock, T. H., Pemberton, J. M., & Grenfell, B. T. (2004). Why large-scale climate indices seem to predict ecological processes better than local weather. *Nature*, 430(6995), 71-75. <https://doi.org/10.1038/nature02708>

- Hamlin, H. J., Lowers, R. H., Albergotti, L. C., McCoy, M. W., Mutz, J., & Guillette Jr, L. J. (2010). Environmental influence on yolk steroids in American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Biology of reproduction*, 83(5), 736-741. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085142>
- Han, A. L., Paul, K. V., Rao, S., Brechbuhl, H. M., Sartorius, C. A., Ramachandran, S., & Kabos, P. (2025). Estradiol (E2) concentration shapes the chromatin binding landscape of estrogen receptor alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 301(7). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.108499>
- Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical biochemistry*, 90(1), 420-426. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90046-5).
- Hara, S., Furukawa, F., Mukai, K., Yazawa, T., & Kitano, T. (2020). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is involved in the temperature-induced sex differentiation of a vertebrate. *Scientific reports*, 10(1), 11672. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68594-y>
- Hartig, F. (2016). DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. *CRAN: Contributed Packages*.
- Henley, D.V., Lindzey, J., Korach, K.S. (2005). Steroid hormones. In Melmed, S. & Conn, P.M. (Eds.), *Endocrinology* (pp. 49-65). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-829-8_4
- Henne, W. M., Reese, M. L., & Goodman, J. M. (2018). The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *The EMBO journal*, 37(12), e98947. <https://doi.org/10.15252/emj.2019101816>
- Himmelstein, R., Spahija, A., & Fokidis, H. B. (2021). Evidence for fasting induced extra-adrenal steroidogenesis in the male brown anole, *Anolis sagrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 253, 110544. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110544>
- Hixson, S. M., & Arts, M. T. (2016). Climate warming is predicted to reduce omega-3, long-chain, polyunsaturated fatty acid production in phytoplankton. *Global change biology*, 22(8), 2744-2755. <https://doi.org/10.1111/gcb.13295>
- Hsu, B.-Y., Dijkstra, C., & Groothuis, T. G. G. (2016). No escape from mother's will: Effects of maternal testosterone on offspring reproductive behaviour far into adulthood. *Animal Behavior*, 117, 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.05.004>

Huang, V., Bowden, R. M., & Crews, D. (2013). Yolk-albumen testosterone in a lizard with temperature-dependent sex determination: Relation with development. *General and Comparative Endocrinology*, 186, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.019>

Ibarguren, M., López, D. J., & Escribá, P. V. (2014). The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(6), 1518-1528. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.021>

Inamdar-Doddamani, L. S., Vani, V., & Seshagiri, P. B. (2012). A tropical oviparous lizard, *Calotes versicolor*, exhibiting a potentially novel FMFM pattern of temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 317(1), 32–46. <https://doi.org/10.1002/jez.718>

Iungman, J., Piña, C. I., & Siroski, P. (2008). Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia :Alligatoridae). *Genesis*, 46(8), 401–417. <https://doi.org/10.1002/dvg.20413>

Iungman, J. L. (2012). Influencia de la concentración de oxígeno sobre el desarrollo y diferenciación sexual de embriones de *Caiman latirostris*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Iungman, J. L., & Piña, C. I. (2013). Hypoxia and temperature: does hypoxia affect caiman embryo differentiation rate or rate of growth only?. *Journal of Thermal Biology*, 38(7), 407-418. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2013.05.003>

Janes, D. E., Bermudez, D., Guillette, L. J., & Wayne, M. L. (2007). Estrogens induced male production at a female-producing temperature in a reptile (Leopard Gecko, *Eublepharis macularius*) with temperaturedependent sex determination. *Journal of Herpetology*, 41(1), 9–15. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[9:EIMPAA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[9:EIMPAA]2.0.CO;2)

Janes, D. E., Elsey, R. M., Langan, E. M., Valenzuela, N., & Edwards, S. V. (2013). Sex-biased expression of sex-differentiating genes FOXL2 and FGF9 in American alligators, *Alligator mississippiensis*. *Sexual Development*, 7(5), 253-260. <https://doi.org/10.1159/000350787>

Janzen, F. J. (1992). Heritable variation for sex ratio under environmental sex determination in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Genetics*, 131(1), 155–161. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.1.155>

Janzen, F. J., Wilson, M. E., Tucker, J. K., & Ford, S. P. (1998). Endogenous yolk steroid hormones in turtles with different sex-determining mechanisms. *General and Comparative Endocrinology*, 111(3), 306–317. <https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7115>

Jennings, S., Dinmore, T. A., Duplisea, D. E., Warr, K. J., & Lancaster, J. E. (2001). Trawling disturbance can modify benthic production processes. *Journal of Animal ecology*, 70(3), 459–475. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2001.00504.x>

Jenster, G., Spencer, T. E., Burcin, M. M., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor induction of gene transcription: A two-step model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(15), 7879–7884. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.15.7879>

Jeyasuria, P., & Place, A. R. (1998). Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: A role for P450 aromatase (CYP19). *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 428–449. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<428::AID-JEZ8>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<428::AID-JEZ8>3.0.CO;2-Q)

Jiang, Y. X., Shi, W. J., Ma, D. D., Zhang, J. N., Ying, G. G., Zhang, H., & Ong, C. N. (2019). Male-biased zebrafish sex differentiation and metabolomics profile changes caused by dihydrogesterone. *Aquatic Toxicology*, 214, 105242. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105242>

Johnson, G. I. H., & Moore, M. C. (2005). Transfer of maternal corticosterone to yolk in preovulatory and postovulatory tree lizard (*Urosaurus ornatus*) eggs. *Integrative and Comparative Biology*, 45(6), 1021–1021.

Katsu, Y., Bermudez, D. S., Braun, E. L., Helbing, C., Miyagawa, S., Gunderson, M. P., ... & Iguchi, T. (2004). Molecular cloning of the estrogen and progesterone receptors of the American alligator. *General and Comparative Endocrinology*, 136(1), 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.11.008>.

Katsu, Y., Ichikawa, R., Ikeuchi, T., Kohno, S., Guillette, L. J., Jr., & Iguchi, T. (2008). Molecular cloning and characterization of estrogen, androgen, and progesterone nuclear receptors from a freshwater turtle (*Pseudemys nelsoni*). *Endocrinology*, 149(1), 161–173. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0938>

Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., & Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, 122(9), 2813–2822. <https://doi.org/10.1242/dev.122.9.2813>

- Kettlewell, J. R., Raymond, C. S., & Zarkower, D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *genesis*, 26(3), 174-178. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-968X\(200003\)26:3<174::AID-GENE2>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-968X(200003)26:3<174::AID-GENE2>3.0.CO;2-J)
- Kohno, S., Bernhard, M. C., Katsu, Y., Zhu, J., Bryan, T. A., Doheny, B. M., ... & Guillette Jr, L. J. (2015). Estrogen receptor 1 (ESR1; ER α), not ESR2 (ER β), modulates estrogen-induced sex reversal in the American alligator, a species with temperature-dependent sex determination. *Endocrinology*, 156(5), 1887-1899. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1852>
- Kohno, S., Vang, D., Ang, E., Brunell, A. M., Lowers, R. H., & Schoenfuss, H. L. (2020). Estrogen-induced ovarian development is time-limited during the temperature-dependent sex determination of the American alligator. *General and Comparative Endocrinology*, 291, 113397. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113397>
- Kozlowski, C. P., Bauman, J. E., & Hahn, D. C. (2009). A simplified method for extracting androgens from avian egg yolks. *Zoo Biology*, 28(2), 137-143. <https://doi.org/10.1002/zoo.20221>
- Kumar, N., van Faassen, M., Kema, I., Gahr, M., & Groothuis, T. G. (2018). Early embryonic modification of maternal hormones differs systematically among embryos of different laying order: A study in birds. *General and Comparative Endocrinology*, 269, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.08.014>
- Kumar, N., van Dam, A., Permentier, H., van Faassen, M., Kema, I., Gahr, M., & Groothuis, T. G. (2019). Avian yolk androgens are metabolized rather than taken up by the embryo during the first days of incubation. *Journal of Experimental Biology*, 222(7), jeb193961. <https://doi.org/10.1242/jeb.193961>
- Kwan, D. (1994). Fat reserves and reproduction in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Wildlife Research*, 21(3), 257-265. <https://doi.org/10.1071/WR9940257>
- Lance, V. A., & Elsey, R. M. (1986). Stress-induced suppression of testosterone secretion in male alligators. *Journal of Experimental Zoology*, 239(2), 241-246. <https://doi.org/10.1002/jez.1402390211>
- Lance, V. A., Elsey, R. M., & Lang, J. W. (2000). Sex ratios of American alligators (Crocodylidae): male or female biased?. *Journal of Zoology*, 252(1), 71-78. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb00821.x>

Lance, V. A. (2003). Alligator physiology and life history: the importance of temperature. *Experimental gerontology*, 38(7), 801-805. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(03\)00112-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00112-8)

Lang, J. W., & Andrews, H. V. (1994). Temperature-dependent sex determination in crocodilians. *Journal of Experimental Zoology*, 270(1), 28-44. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700105>

Larriera, A., & Imhof, A. (2000). Proyecto yacaré, Santa Fe, Argentina: a sustainable use proposal. In *Crocodiles: Proceedings of the 15th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group* (pp. 311-313).

Larriera, A., & Piña, C. I. (2000). *Caiman latirostris* (Broad-snouted Caiman) nest predation: does low rainfall facilitate predator access. *Herpetological Natural History*, 7(1), 73-77.

Larriera, A., & Imhof, A. (2006). Proyecto yacaré. *Manejo de Fauna Silvestre en Argentina. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación, Buenos Aires*, 51-64.

Laverty, T. M., Dobson, A. P. (2013). Dietary overlap between black caimans and spectacled caimans in the Peruvian Amazon. *Herpetologica*, 69(1), 91-101. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-12-00031>

Lawniczak, C. J., & Teece, M. A. (2009). Lipid metabolism during embryonic development of the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(1), 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.01.016>

Lawrence, C., Ebersole, J. P., & Kesseli, R. V. (2008). Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Biology of Fishes*, 81(2), 239-246. <https://doi.org/10.1007/s10641-007-9195-8>

Leiva, P. M. L., Simoncini, M. S., Portelinha, T. C. G., Larriera, A., & Piña, C. I. (2018a). Size of nesting female Broad-snouted Caimans (*Caiman latirostris* Daudin 1802). *Brazilian Journal of Biology*, 79(1), 139-143. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.180892>

Leiva, P. M. D. L., Lábaque, M. C., Fernández, M. E., Piña, C. I., & Simoncini, M. S. (2018b). Physical and chemical characteristics of fertile and infertile eggs of wild *Caiman latirostris*. *Aquaculture*, 497, 287-291. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.002>

Leiva, P. M. L. (2019). Influencia de los atributos corporales maternos y su interacción con factores climáticos sobre las características de los huevos y la progenie de *Caiman latirostris*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. UNC. Argentina.

Leiva, P. M., Labaque, M. C., Piña, C. I., & Simoncini, M. S. (2023). Influence of climatic variables on corporal attributes of adult female caiman and their relationship with reproductive success. *South American Journal of Herpetology*, 28(1), 16-25. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-21-00033.1>

Lessells, C. M., Ruuskanen, S., & Schwabl, H. (2016). Yolk steroids in great tit *Parus major* eggs: variation and covariation between hormones and with environmental and parental factors. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(6), 843-856. <https://doi.org/10.1007/s00265-016-2107-1>

Levin, E. R., & Hammes, S. R. (2016). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(12), 783-797. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.122>

Li, Q., Shao, W., Jiang, Y., Yan, C., & Liao, W. (2024). Assessing reptile conservation status under global climate change. *Biology*, 13(6), 436. <https://doi.org/10.3390/biology13060436>

Lin, J. Q., Zhou, Q., Yang, H. Q., Fang, L. M., Tang, K. Y., Sun, L., Wan, Q. H., & Fang, S. G. (2018). Molecular mechanism of temperature-dependent sex determination and differentiation in *Chinese alligator* revealed by developmental transcriptome profiling. *Science Bulletin*, 63(4), 209–212. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2018.01.004>

Linja, M. J., Porkka, K. P., Kang, Z., Savinainen, K. J., Jänne, O. A., Tammela, T. L., ... & Visakorpi, T. (2004). Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(3), 1032-1040. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0990-3>

Literman, R., Burrett, A., Bista, B., & Valenzuela, N. (2018). Putative independent evolutionary reversals from genotypic to temperature-dependent sex determination are associated with accelerated evolution of sex-determining genes in turtles. *Journal of Molecular Evolution*, 86(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s00239-017-9820-x>

Lockley, E. C., Reischig, T., & Eizaguirre, C. (2020). Maternally derived sex steroid hormones impact sex ratios of loggerhead sea turtles. *bioRxiv*, 2020-01. <https://doi.org/10.1101/2020.01.10.901520>

Lockley, E. C., & Eizaguirre, C. (2021). Effects of global warming on species with temperature-dependent sex determination: Bridging the gap between empirical research and management. *Evolutionary Applications*, 14(10), 2361-2377. <https://doi.org/10.1111/eva.13226>

Lovern, M. B., & Wade, J. (2001). Maternal plasma and egg yolk testosterone concentrations during embryonic development in green anoles (*Anolis carolinensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 124(2), 226–235. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7704>

Malhi, Y., Lander, T., le Roux, E., Stevens, N., Macias-Fauria, M., Wedding, L., ... & Canney, S. (2022). The role of large wild animals in climate change mitigation and adaptation. *Current Biology*, 32(4), R181-R196.

Maneechan, W., & Prommi, T. O. (2021). Nutrient composition and bioaccumulation of an edible aquatic insect, *Pantala* sp.(Odonata: Libellulidae) from the rice field. *BioRxiv*, 2021-12. <https://doi.org/10.1101/2021.12.26.474203>

Marinero, M. J., Penalva, V., Oliva, J. L., Colás, B., Prieto, J. C., & López-Ruiz, M. P. (1998). Specific effect of arachidonic acid on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *FEBS letters*, 422(1), 10-14. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01584-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01584-6)

Marroquín-Flores, R. A., Bowden, R. M., & Paitz, R. T. (2021). Brief exposure to warm temperatures reduces intron retention in Kdm6b in a species with temperature-dependent sex determination. *Biology Letters*, 17(6), 20210167. <https://doi.org/10.1126/science.aap8328>

Marroquín-Flores, R. A., Paitz, R. T., & Bowden, R. M. (2022). Temperature fluctuations and estrone sulfate affect gene expression via different mechanisms to promote female development in a species with temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Biology*, 225(16), jeb244211. <https://doi.org/10.1242/jeb.244211>

Marshall, J. D., & Uller, T. (2007). When is a maternal effect adaptive?. *Oikos*, 116(12), 1957-1963. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x>

Martínez-Juárez, A., López-Luna, M. A., Porras-Gómez, T. J., & Moreno-Mendoza, N. (2018). Expression of the Sox9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 330(3), 148-164. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22799>

Martínez-Juárez, A., & Moreno-Mendoza, N. (2019). Mechanisms related to sexual determination by temperature in reptiles. *Journal of Thermal Biology*, 85, 102400. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102400>

McKeegan, P. J., & Sturme, R. G. (2011). The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 59-67. <https://doi.org/10.1071/RD11907>

Matsubara, K. (2018). Evolutionary process of sex chromosomes and sex determination systems in reptiles. *Chromosome Science*, 21(2–4), 47–53. <https://doi.org/10.11352/scr.21.47>

Matsumoto, Y., & Crews, D. (2012). Molecular mechanisms of temperature dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354(1–2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.012>

Matsumoto, Y., Yatsu, R., Taylor, C., & Crews, D. (2013). Changes in gonadal gene network by exogenous ligands in temperaturedependent sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology*, 50(3), 389–400. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0260>

Matsumoto, Y., Hannigan, B., & Crews, D. (2016). Temperature shift alters DNA methylation and histone modification patterns in gonadal aromatase (*cyp19a1*) gene in species with temperature-dependent sex determination. *PLoS One*, 11(11), e0167362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167362>

Meikle, A. W., de Sousa, J. C. C., Hanzalova, J., & Murray, D. K. (1996). Oleic acid inhibits cholesteryl esterase and cholesterol utilization for testosterone synthesis in mouse Leydig cells. *Metabolism*, 45(3), 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(96\)90281-4](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(96)90281-4)

Messel, H., King, F. W., & Ross, J. P. (1995). Introducción: la conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos. *La conservación y el manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina*, 1, 1–3. In A. Larriera & L. M. Verdade (Eds.), *La Conservación y el Manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina* Vol 1 (pp. 1–3). Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Santa Fe, Argentina.

Meylan, S., Belliure, J., Clobert, J., & de Fraipont, M. (2002). Stress and body condition as prenatal and postnatal determinants of dispersal in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *Hormones and Behavior*, 42(3), 319–326. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1827>

Milnes Jr, M. R., Roberts, R. N., & Guillette Jr, L. J. (2002). Effects of incubation temperature and estrogen exposure on aromatase activity in the brain and gonads of embryonic alligators. *Environmental Health Perspectives*, 110, 393–396. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s3393>

Milnes, M. R., & Moore, B. C. (2024). Hormones and reproductive cycles in crocodilians. In *Hormones and reproduction of vertebrates* (pp. 271–288). Academic Press.

Mitchell, N. J., Nelson, N. J., Cree, A., Pledger, S., Keall, S. N., & Daugherty, C. H. (2006). Support for a rare pattern of temperaturedependent sex determination in archaic reptiles: Evidence from two species of tuatara (Sphenodon). *Frontiers in Zoology*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-3-9>

- Mizoguchi, B. A., & Valenzuela, N. (2016). Ecotoxicological perspectives of sex determination. *Sexual Development*, 10(1), 45–57. <https://doi.org/10.1159/000444770>
- Montini, J. P., Piña, C. I., Larriera, A., Siroski, P., Verdade, L. M. (2006). The relationship between nesting habitat and hatching success in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 5(2), 91-96.
- Mooradian, A. D., Pamplona, D. M., Viosca, S. P., & Korenman, S. G. (1988). Effect of free fatty acids on the bioavailability of plasma testosterone and dihydrotestosterone. *Journal of steroid biochemistry*, 29(3), 369-370. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(88\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0022-4731(88)90040-4)
- Moore, M. C., & Johnston, G. I. (2008). Toward a dynamic model of deposition and utilization of yolk steroids. *Integrative and comparative biology*, 48(3), 411-418. <https://doi.org/10.1093/icb/icn079>
- Morales-Arango, J., Duarte-Guerrero, M., & Zúñiga, H. (2007). Caracterización físico-química del huevo del caimán llanero, *Crocodylus intermedius*, Graves 1819. *Acta zoológica mexicana*, 23(3), 17-27.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V. R., & Merchant-Larios, H. (1999). Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male-or female-promoting temperatures. *Journal of Experimental Zoology*, 284(6), 705–710. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19991101\)284:6<705::aid-jez12>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19991101)284:6<705::aid-jez12>3.0.co;2-1)
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V. R., & Merchant-Larios, H. (2001). Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Developmental Biology*, 229(2), 319-326. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9952>
- Morosinotto, C., Thomson, R. L., Ruuskanen, S., Korpimäki, E., Lehtikoinen, E., Möstl, E., & Laaksonen, T. (2016). Maternal transfer of androgens in eggs is affected by food supplementation but not by predation risk. *Journal of Avian Biology*, 47(5), 629-641. <https://doi.org/10.1111/jav.00874>
- Mouton, J. C., & Duckworth, R. A. (2021). Maternally derived hormones, neurosteroids and the development of behaviour. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1943), 20202467. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2467>
- Murdock, C., & Wibbels, T. (2003). Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenetic and genome research*, 101(3-4), 302-308. <https://doi.org/10.1159/000074353>

- Munns, S. L., Evans, B. K., & Frappell, P. B. (1998). The effects of environmental temperature, hypoxia, and hypercapnia on the breathing pattern of saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Physiological zoology*, 71(3), 267-273. <https://doi.org/10.1086/515913>
- Murphy Jr, G., Rouse, R. L., Polk, W. W., Henk, W. G., Barker, S. A., Boudreaux, M. J., ... & Penn, A. L. (2008). Combustion-derived hydrocarbons localize to lipid droplets in respiratory cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 38(5), 532-540. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0204OC>
- Murray, C. M., Easter, M., Merchant, M., Rheubert, J. L., Wilson, K. A., Cooper, A., Mendonça, M., Wibbels, T., Marin, M. S., & Guyer, C. (2016). Methyltestosterone alters sex determination in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 236, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.07.007>
- Murru, E., Manca, C., Carta, G., & Banni, S. (2022). Impact of dietary palmitic acid on lipid metabolism. *Frontiers in Nutrition*, 9, 861664. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.861664>
- Navarro-Martín, L., Vinas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutierrez, A., Di Croce, L., & Piferrer, F. (2011). DNA methylation of the gonadal aromatase (cyp19a) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genetics*, 7(12), e1002447. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002447>
- Nelson, T. C., Groth, K. D., & Sotherland, P. R. (2010). Maternal investment and nutrient use affect phenotype of American alligator and domestic chicken hatchlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.05.010>
- Neuringer, M., Anderson, G. J., & Connor, W. E. (1988). The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annual review of nutrition*, 8, 517-541. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.08.070188.002505>
- Noble, R. C., Deeming, D. C., Ferguson, M. W. J., & McCartney, R. (1990). Changes in the lipid and fatty acid composition of the yolk during embryonic development of the alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 96(1), 183-187.
- Noble, R. C., Deeming, D. C., Ferguson, M. W. J., & McCartney, R. (1991). The utilisation of yolk phosphoglycerides by the alligator during embryonic development. *Journal of Comparative Physiology B*, 161, 383-386. <https://doi.org/10.1007/BF00260797>

Noble, R. C., Deeming, D. C., Ferguson, M. W. J., & McCartney, R. (1993a). The effect of incubation temperature on yolk lipid parameters during embryonic development of the alligator (*Alligator mississippiensis*). *Lipids*, 28(2), 135-140. <https://doi.org/10.1007/BF02535777>

Noble, R. C., McCartney, R., & Ferguson, M. W. J. (1993b). Lipid and fatty acid compositional differences between eggs of wild and captive-breeding alligators (*Alligator mississippiensis*): an association with reduced hatchability?. *Journal of Zoology*, 230(4), 639-649. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1993.tb02712.x>

Ogino, Y., Tohyama, S., Kohno, S., Toyota, K., Yamada, G., Yatsu, R., Kobayashi, T., Tatarazako, N., Sato, T., Matsubara, H., Lange, A., Tyler, C. R., Katsu, Y., Iguchi, T., & Miyagawa, S. (2018). Functional distinctions associated with the diversity of sex steroid hormone receptors ESR and AR. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 184, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.06.002>

Ojeda Adame, R. A., Larriera, A., Piña, C. I. (2018). Relationship between predators and parental care of *Caiman latirostris*. En: Proceedings of the 25th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group – IUCN – The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge UK.

Oksanen, J., Kindt, R., & O'Hara, B. (2005). Community ecology package. *R package*. URL <http://cc.oulu.fi/jarioksa>.

Paitz, R. T., & Bowden, R. M. (2008). A proposed role of the sulfotransferase/sulfatase pathway in modulating yolk steroid effects. *Integrative and Comparative Biology*, 48(3), 419–427. <https://doi.org/10.1093/icb/icn034>

Paitz, R. T., & Bowden, R. M. (2009). Rapid decline in the concentrations of three yolk steroids during development: Is it embryonic regulation? *General and Comparative Endocrinology*, 161(2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.01.018>

Paitz, R. T., Sawa, A. R., & Bowden, R. M. (2012). Characterizing the metabolism and movement of yolk estradiol during embryonic development in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). *General and Comparative Endocrinology*, 176(3), 507–512. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.10.009>

Paitz, R. T., & Bowden, R. M. (2013). Sulfonation of maternal steroids is a conserved metabolic pathway in vertebrates. *Integrative and Comparative Biology*, 53(6), 895–901. <https://doi.org/10.1093/icb/ict027>

Palmer, W. C. (1965). *Meteorological drought* (30). US Department of Commerce, Weather Bureau.

Parachú-Marcó, M. V., Leiva, P. M. D. L., Iungman, J. L., Simoncini, M. S., & Piña, C. I. (2017). New evidence characterizing temperature-dependent sex determination in broad-snouted caiman, *Caiman latirostris*. *Herpetological Conservation and Biology*, 12, 78-84.

Pereira, C. C., Kenedy-Siqueira, W., Negreiros, D., Fernandes, S., Barbosa, M., Goulart, F. F., ... & Fernandes, G. W. (2024). Scientists' warning: six key points where biodiversity can improve climate change mitigation. *BioScience*, 74(5), 315-318. <https://doi.org/10.1093/biosci/biae035>

Petelle, M. B., Dang, B. N., & Blumstein, D. T. (2017). The effect of maternal glucocorticoid levels on juvenile docility in yellow-bellied marmots. *Hormones and Behavior*, 89, 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.12.014>

Pieau, C., Girondot, M., Richard-Mercier, N., Desvages, G., Dorizzi, M., & Zaborski, P. (1994). Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: Hormonal involvement. *Journal of Experimental Zoology*, 270(1), 86-94. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700110>

Pieau, C. (1996). Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays*, 18(1), 19-26. <https://doi.org/10.1002/bies.950180107>

Pieau, C., & Dorizzi, M. (2004). Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *Journal of Endocrinology*, 181(3), 367-377. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1810367>

Pierini, S. E., Simoncini, M. S., Larriera, A., Guarascio, V. F., Scarpa, L. J., & Piña, C. I. (2024). Camera-traps detect the maned wolf preying on broad-snouted caiman eggs. *Global Ecology and Conservation*, 51, e02916. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2024.e02916>

Pierini, S. E., Imhof, A., Larriera, A., Simoncini, M. S., Príncipe, G., & Piña, C. I. (2022). Nest-sharing behavior of captive Broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*): cooperation or exploitation?. *Amphibia-Reptilia*, 44(1), 95-101. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10118>

Pierini, S. E., Adjad, F., Bauso, J., Imhof, A., Piña, C. I., & Simoncini, M. S (2025). Dietary patterns of Yacare in the wetlands of Corrientes, Argentina. *Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1111/jzo.70049>

Pinheiro J, Bates D, R Core Team (2023). *_nlme: Linear and nonlinear mixed effects models_*. R package version 3.1-162, <<https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>.

Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L. A., Ferreira, T., ... & Barelli, H. (2014). Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science*, 345(6197), 693-697. <https://doi.org/10.1126/science.1255288>

Piña C. I. (2002). Un estudio del efecto de las temperaturas de incubación en la determinación sexual y el primer año de crecimiento del yacaré overo, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. UNC. Argentina.

Piña, C. I., Larriera, A., & Cabrera, M. R. (2003). Effect of incubation temperature on incubation period, sex ratio, hatching success, and survivorship in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *Journal of Herpetology*, 37(1), 199-202. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2003\)037\[0199:EOITOI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2003)037[0199:EOITOI]2.0.CO;2)

Piña, C. I., Larriera, A., & Siroski, P. (2004). Cocodrilos en la Región Litoral: especies, distribución geográfica, modo de vida. *Miscelánea (INSUGEO)*, 12, 317-322.

Piña, C., Siroski, P., Larriera, A., Lance, V., & Verdade, L. M. (2007). The temperature-sensitive period (TSP) during incubation of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) eggs. *Amphibia-Reptilia*, 28(1), 123-128.

Pond, C. M. (1978). Morphological aspects and the ecological and mechanical consequences of fat deposition in wild vertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 9, 519-570.

Portelinha, T. C., Jahn, G. A., Hapon, M. B., Verdade, L. M., & Piña, C. I. (2015). Hormone levels and ultrasound evaluation of *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) ovulation. *South American Journal of Herpetology*, 10(1), 23-31. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-14-00030.1>

Potticary, A. L., & Duckworth, R. A. (2018). Environmental mismatch results in emergence of cooperative behavior in a passerine bird. *Evolutionary Ecology*, 32, 215-229.

Pounds, J.A, Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P., Foster, P. N., ... & Young, B. E. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161-167. <https://doi.org/10.1038/nature04246>

Powell, B., Bhatt, I. D., Mucioki, M., Rana, S., Rawat, S., & Kerr, R. B. (2023). The need to include wild foods in climate change adaptation strategies. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 63, 101302. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2023.101302>

Pradesh, A. (2011). Chemical composition of *Aspongopus nepalensis* Westwood 1837 (Hemiptera; Pentatomidae), a common food insect of tribal people. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 81, 49-56. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000050>

Price, E. R. (2017). The physiology of lipid storage and use in reptiles. *Biological Reviews*, 92(3), 1406-1426. <https://doi.org/10.1111/brv.12288>

Radder, R. S. (2007). Maternally derived egg yolk steroid hormones and sex determination: review of a paradox in reptiles. *Journal of biosciences*, 32, 1213-1220. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0123-z>

Radder, R. S., Pike, D. A., Quinn, A. E., & Shine, R. (2009). Offspring sex in a lizard depends on egg size. *Current Biology*, 19(13), 1102–1105. [10.1016/j.cub.2009.05.027](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.027)

Radhakrishnan, S., Literman, R., Neuwald, J., Severin, A., & Valenzuela, N. (2017). Transcriptomic responses to environmental temperature by turtles with temperature-dependent and genotypic sex determination assessed by RNAseq inform the genetic architecture of embryonic gonadal development. *PLoS One*, 12(3), e0172044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172044>

Radhakrishnan, S., Literman, R., Neuwald, J. L., & Valenzuela, N. (2018). Thermal response of epigenetic genes informs turtle sex determination with and without sex chromosomes. *Sexual Development*, 12(6), 308–319. <https://doi.org/10.1159/000492188>

Ramsey, M., & Crews, D. (2007). Adrenal–kidney–gonad complex measurements may not predict gonad-specific changes in gene expression patterns during temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307(8), 463-470. <https://doi.org/10.1002/jez.399>

Ramsey, M., & Crews, D. (2009). Steroid signaling and temperature-dependent sex determination—Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. In *Seminars in cell & developmental biology* (pp. 283-292). Academic Press.

Rhen, T., & Lang, J. W. (1994). Temperature-dependent sex determination in the snapping turtle: Manipulation of the embryonic sex steroid environment. *General and Comparative Endocrinology*, 96(2), 243–254. <https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1179>

Rhen, T., Crews, D., Fivizzani, A., & Elf, P. (2006). Reproductive tradeoffs and yolk steroids in female leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(6), 1819–1829. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01180.x>

Rhen, T., Metzger, K., Schroeder, A., & Woodward, R. (2007). Expression of putative sex-determining genes during the thermosensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Sexual Development*, 1(4), 255-270. <https://doi.org/10.1159/000104775>

Rhodes, W. E., & Lang, J. W. (1996). Alligator nest temperatures and hatchling sex ratios in coastal South Carolina. In *Proceedings of the annual conference of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies* (pp. 521-531).

Robinson-Rechavi, M., Garcia, H. E., & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of cell science*, 116(4), 585-586. <https://doi.org/10.1242/jcs.00247>

Robitaille, J., & Langlois, V. S. (2020). Consequences of steroid-5 α -reductase deficiency and inhibition in vertebrates. *General and comparative endocrinology*, 290, 113400. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113400>

Roush, D., & Rhen, T. (2018). Developmental plasticity in reptiles: Critical evaluation of the evidence for genetic and maternal effects on temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329(6-7), 287-297. <https://doi.org/10.1002/jez.2194>

Rutstein, A. N., Gilbert, L., Slater, P. J., & Graves, J. A. (2005). Sex-specific patterns of yolk androgen allocation depend on maternal diet in the zebra finch. *Behavioral Ecology*, 16(1), 62-69. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh123>

Sakae, Y., & Tanaka, M. (2021). Metabolism and sex differentiation in animals from a starvation perspective. *Sexual Development*, 15(1-3), 168-178. <https://doi.org/10.1159/000515281>

Sanhueza Catalán, J., Durán Agüero, S., Torres García, J. (2015). Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. *Nutrición hospitalaria*, 32(3), 1362-1375. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.3.9276>

Schroeder, A., & Rhen, T. (2019). Role for androgens in determination of ovarian fate in the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *General and comparative endocrinology*, 281, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.05.003>

Schwabl, H. (1993). Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11446-11450. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11446>

Selwood, K. E., McGeoch, M. A., & Mac Nally, R. (2015). The effects of climate change and land-use change on demographic rates and population viability. *Biological Reviews*, 90(3), 837-853. <https://doi.org/10.1111/brv.12136>

Sievert, C. (2020). *Interactive web-based data visualization with R, plotly, and shiny*. Chapman and Hall/CRC.

She, Z. Y., & Yang, W. X. (2014). Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53(1), R21–R37. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0018>

Shoemaker, C. M., Queen, J., & Crews, D. (2007a). Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Molecular Endocrinology*, 21(11), 2750–2763. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0263>

Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., & Crews, D. (2007b). Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature dependent sex determination. *Developmental Dynamics*, 236(4), 1055–1063. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21096>

Shoemaker, C. M., & Crews, D. (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(3), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.10.010>

Simpkins, G. (2023). Protecting reptiles and amphibians. *Nature Reviews Earth & Environment*, 4(6), 359–359. <https://doi.org/10.1038/s43017-023-00445-6>

Sifuentes-Romero, I., Merchant-Larios, H., Milton, S. L., Moreno-Mendoza, N., Díaz-Hernández, V., & García-Gasca, A. (2013). RNAi-mediated gene silencing in a gonad organ culture to study sex determination mechanisms in sea turtle. *Genes*, 4(2), 293–305. <https://doi.org/10.3390/genes4020293>

Simoncini, M. S., Piña, C. I., & Siroski, P. A. (2009). Clutch size of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae) varies on a latitudinal gradient. *North-Western Journal of Zoology*, 5(1), 191–196.

Simoncini, M. S., Piña, C. I., Cruz, F. B., & Larriera, A. (2011). Climatic effects on the reproductive biology of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Amphibia-Reptilia*, 32(3), 305–314.

Simoncini, M. S., Cruz, F. B., Larriera, A., & Piña, C. I. (2014). Effects of climatic conditions on sex ratios in nests of broad-snouted caiman. *Journal of Zoology*, 293(4), 243–251. <https://doi.org/10.1111/jzo.12140>

Simoncini, M. S., Leiva, P. M., Piña, C. I., & Cruz, F. B. (2019). Influence of temperature variation on incubation period, hatching success, sex ratio, and phenotypes in *Caiman latirostris*.

Journal of Experimental Zoology Part A: *Ecological and Integrative Physiology*, 331(5), 299–307. <https://doi.org/10.1002/jez.2265>

Simoncini, M. S., Lábaque, M. C., Perlo, F., Fernandez, M. E., Leiva, P. M., Paez, A. R., ... & Piña, C. I. (2020). *Caiman latirostris* meat characterization: Evaluation of the nutritional, physical and chemical properties of meat from sustainable ranching program in Argentina. *Aquaculture*, 515, 734570. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734570>

Singh, S. K., Das, D., & Rhen, T. (2020). Embryonic temperature programs phenotype in reptiles. *Frontiers in Physiology*, 11, 35. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00035>

Smith, C. A., & Joss, J. M. (1994a). Steroidogenic enzyme activity and ovarian differentiation in the saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*. *General and Comparative Endocrinology*, 93(2), 232–245. <https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1027>

Smith, C. A., & Joss, J. M. P. (1994b). Uptake of 3H-estradiol by embryonic crocodile gonads during the period of sexual differentiation. *Journal of Experimental Zoology*, 270(2), 219–224.

Smith, C. A., Elf, P. K., Lang, J. W., & Joss, J. M. (1995). Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos. *Differentiation*, 58(4), 281–290. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1995.5840281.x>

Smith, C. A., Smith, M. J., & Sinclair, A. H. (1999). Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene*, 234(2), 395–402. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00179-1)

Smith, C. A., Shoemaker, C. M., Roeszler, K. N., Queen, J., Crews, D., & Sinclair, A. H. (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Developmental Biology*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-72>

Speake, B. K., Noble, R. C., McCartney, R. J., & Ferguson, M. W. J. (1994). Differences in tissue-specific lipid composition between embryos of wild and captive breeding alligators (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Zoology*, 234(4), 565–576. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1994.tb04865.x>

Speake, B. K., & Thompson, M. B. (1999). Comparative aspects of yolk lipid utilisation in birds and reptiles. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 10(4), 181–211.

Speake, B. K., & Deans, E. A. (2004). Biosynthesis of oleic, arachidonic and docosahexaenoic acids from their C18 precursors in the yolk sac membrane of the avian embryo. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 138(4), 407-414.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.05.006>

Stenseth, N. C., & Mysterud, A. (2002). Climate, changing phenology, and other life history traits: nonlinearity and match–mismatch to the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13379-13381. <https://doi.org/10.1073/pnas.212519399>

Stoker, C., Rey, F., Rodriguez, H., Ramos, J. G., Sirosky, P., Larriera, A., ...Muñoz-de-Toro, M. (2003). Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology*, 133(3), 287–296.
[https://doi.org/10.1016/s0016-6480\(03\)00199-0](https://doi.org/10.1016/s0016-6480(03)00199-0)

Stocker, T. (Ed.). (2014). *Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge university press.

Tan, K., Zhang, H., & Zheng, H. (2022). Climate change and n-3 LC-PUFA availability. *Progress in lipid research*, 86, 101161. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101161>

Tan, K., Ransangan, J., Tan, K., & Cheong, K. L. (2024). The impact of climate change on Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in bivalves. *Critical reviews in food science and nutrition*, 64(31), 11661-11671. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2242943>

Tang, H., & Han, M. (2017). Fatty acids regulate germline sex determination through ACS-4-dependent myristoylation. *Cell*, 169(3), 457-469. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.049>

Tavalieri, Y. E., Galoppo, G. H., Canesini, G., Truter, J. C., Ramos, J. G., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2019). The external genitalia in juvenile *Caiman latirostris* differ in hormone sex determinate-female from temperature sex determinate-female. *General and Comparative Endocrinology*, 273, 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.10.003>

Thompson, M. B., & Speake, B. K. (2002). Energy and nutrient utilisation by embryonic reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(3), 529-538. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00188-5)

Thompson, M. B., & Speake, B. K. (2004). Egg morphology and composition. In D.C., Deeming (Ed.), *Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour* (pp. 45–73). Nottingham University Press, United Kingdom.

Tissier, M. L., Williams, T. D., & Criscuolo, F. (2014). Maternal effects underlie ageing costs of growth in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *PloS one*, 9(5), e97705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097705>

Topping, N. E., & Valenzuela, N. (2023). Thermal response of circulating estrogens in an Emydid turtle, *Chrysemys picta*, and the challenges of climate change. *Diversity*, 15(3), 428. <https://doi.org/10.3390/d15030428>

Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A. C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N. I., Riethmacher, D., Schütz, G., Cooney, A. J., Lovell-Badge, R., & Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139(6), 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>

Urushitani, H., Katsu, Y., Miyagawa, S., Kohno, S., Ohta, Y., Guillelte Jr, L. J., & Iguchi, T. (2011). Molecular cloning of anti-Müllerian hormone from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 333(2), 190-199. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.12.025>

Valenzuela, N. (2008). Relic thermosensitive gene expression in a turtle with genotypic sex determination. *Evolution*, 62(1), 234–240. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00279.x>

Valleley, E. M., Cartwright, E. J., Croft, N. J., Markham, A. F., & Coletta, P. L. (2001). Characterisation and expression of Sox9 in the Leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology*, 291(1), 85–91. <https://doi.org/10.1002/jez.7>

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs Jr, D. R., Lee, D. H., ... & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*, 33(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>.

Vay, L., Gu, C., & McNaughton, P. A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: Properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology*, 165(4), 787–801. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>

Verdade, L. M., & Sarkis, F. (1998). Age at first reproduction in captive *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). *Herpetological Review*, 29(4), 227.

Verdade, L. M., Sarkis-Goncalves, F., Miranda-Vilela, M. P., & Bassetti, L. A. B. (2003). New record of age at sexual maturity in captivity for *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman). *Herpetological Review*, 34(3), 225-271.

Verdade, L. M., Larriera, A., & Piña, C. I. (2010). Broad-snouted caiman *Caiman latirostris*. *Crocodiles status survey and conservation action plan*, 18, 22.

Verderame, M., & Scudiero, R. (2018). A comparative review on estrogen receptors in the reproductive male tract of non mammalian vertebrates. *Steroids*, 134, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.04.001>

Vining, B., Ming, Z., Bagheri-Fam, S., & Harley, V. (2021). Diverse regulation but conserved function: SOX9 in vertebrate sex determination. *Genes*, 12(4), 486. <https://doi.org/10.3390/genes12040486>

Viotto, E.; Leiva P.M.L.; Ciocan, H.; Simoncini, M.; Piña, C.I. (2018). Body condition analysis over time in *Caiman latirostris*. En: *Proceedings of the 25th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group – IUCN – The World Conservation Union*, Gland, Switzerland and Cambridge UK.

Viotto, E. V., Simoncini, M. S., Verdade, L. M., Navarro, J. L., & Piña, C. (2022). Winter survivorship of hatchling broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*) in Argentina. *Ethnobiology and Conservation*, 11. <https://doi.org/10.15451/ec2022-07-11.18-1-13>

Viotto, E. V., Iugman, J. L., Valli, F. E., Pierini, S. E., Simoncini, M. S., Somoza, G. M., Piña, C. I. (En revisión). Effect of prenatal exposure to corticosterone on broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings.

Waller, T., & Micucci, P. A. (1992). Relevamiento de la distribución, hábitat y abundancia de los crocodilos de la República Argentina. *Fase I (1990/91): provincia de Corrientes*.

Walther, T. C., & Farese Jr, R. V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual review of biochemistry*, 81(1), 687-714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>

Wang, X., Ding, Z., Wu, P., Fu, J., & Du, W (2025). Estrogen receptor and temperature independently influence sex determination in the red-eared slider turtle. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1632672. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1632672>

Warren, R., Price, J., & Jenkins, R. (2021). Climate change and terrestrial biodiversity. In *The impacts of climate change* (pp. 85-114). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822373-4.00025-2>

Watanabe, S., Tani, T., Watanabe, S., & Senō, M. (1990). Effects of free fatty acids on the binding of steroid hormones to bovine serum albumin. *Lipids*, 25(10), 633-638. <https://doi.org/10.1007/BF02536014>

Warner, D. A., & Shine, R. (2008). The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature*, 451(7178), 566–568. <https://doi.org/10.1038/nature06519>

Warner, D. A., Radder, R. S., & Shine, R. (2009). Corticosterone exposure during embryonic development affects offspring growth and sex ratios in opposing directions in two lizard species with environmental sex determination. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(4), 363–371. <https://doi.org/10.1086/588491>

Warner, D. A., Mitchell, T. S., Bodensteiner, B. L., & Janzen, F. J. (2017). The effect of hormone manipulations on sex ratios varies with environmental conditions in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 327(4), 172–181. <https://doi.org/10.1002/jez.2085>

Webb, G. J. W., Manolis, S. C., Dempsey, K. E., & Whitehead, P. J. (1987). Crocodilian eggs: a functional overview. *Wildlife Management: Crocodiles and Alligators. Chipping Norton, Australia: Surrey Beatty and Sons and the Conservation Commission of the Northern Territory*, 417–422.

Weber, C., & Capel, B. (2021). Sex determination without sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1832), 20200109. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0109>

Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J. A., & Sinclair, A. H. (1999a). Temperature-dependent sex determination: Upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Developmental Dynamics*, 214(3), 171–177.

Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J. A., & Sinclair, A. H. (1999b). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Developmental Dynamics*, 216(4–5), 411–419. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199912\)216:4/5<411::AID-DVDY9>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199912)216:4/5<411::AID-DVDY9>3.0.CO;2-Y)

White, T. (2008). The role of food, weather and climate in limiting the abundance of animals. *Biological Reviews*, 83(3), 227–248. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00041.x>

Wibbels, T., Bull, J. J., & Crews, D. (1991). Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination? *Journal of Experimental Zoology*, 260(1), 130–134. <https://doi.org/10.1002/jez.1402600117>

Wibbels, T., & Crews, D. (1992). Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. *Journal of Endocrinology*, 133(1), 121–129. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1330121>

Wibbels, T., & Crews, D. (1994). Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature-dependent sex determination. *The Journal of Endocrinology*, 141(2), 295–299. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1410295>

Wibbels, T., & Crews, D. (1995). Steroid-induced sex determination at incubation temperatures producing mixed sex ratios in a turtle with TSD. *General and Comparative Endocrinology*, 100(1), 53–60. <https://doi.org/10.1006/gcen.1995.1132>

Wibbels, T., Cowan, J., & LeBoeuf, R. (1998). Temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 409–416. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19980801\)281:5<409::aid-jez6>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19980801)281:5<409::aid-jez6>3.0.co;2-s)

Wickham, H. (2009). Elegant graphics for data analysis (ggplot2). *Applied spatial data analysis R*, 784, 785.

Wickham, H. (2015). dplyr: A grammar of data manipulation. *R package version 04.*, 3, p. 156.

Winter, M., Fiedler, W., Hochachka, W. M., Koehncke, A., Meiri, S., & De la Riva, I. (2016). Patterns and biases in climate change research on amphibians and reptiles: a systematic review. *Royal Society Open Science*, 3(9), 160158. <https://doi.org/10.1098/rsos.160158>

Wood, S. N. (2025). Generalized additive models. *Annual review of statistics and its application*, 12(1), 497–526. <https://doi.org/10.1146/annurev-statistics-112723-034249>

Wu, P. F., Wang, X. F., Gao, F., & Du, W. G. (2022). Role of *Cyp19a1* in the female pathway of a freshwater turtle species (*Mauremys reevesii*) with temperature-dependent sex determination. *Zoological Research*, 43(1), 81–84. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.287>

Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R. H., Ogino, Y., Fukuta, N., Katsu, Y., Ohta, Y., Tominaga, M., Guillelte Jr, L. J., & Iguchi, T. (2015). TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. *Scientific Reports*, 5(1), 18581. <https://doi.org/10.1038/srep18581>

Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Parrott, B. B., Yamaguchi, K., Ogino, Y., Miyakawa, H., Lowers, R. H., Shigenobu, S., Guillelte, L. J., Jr., & Iguchi, T. (2016). RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during *Alligator mississippiensis* temperature-dependent sex determination and differentiation. *BMC Genomics*, 17, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2396-9>

Yazawa, T., Inaba, H., Imamichi, Y., Sekiguchi, T., Uwada, J., Islam, M. S., ... & Kitano, T. (2021). Profiles of 5 α -reduced androgens in humans and eels: 5 α -dihydrotestosterone and 11-

ketodihydrotestosterone are active androgens produced in eel gonads. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 657360. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.657360>

Yoon, M. (2009). The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions. *Pharmacological Research*, 60(3), 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.02.004>

Zhou, X., Mo, Z., Li, Y., Huang, L., Yu, S., Ge, L., ... & Chu, G. (2022). Oleic acid reduces steroidogenesis by changing the lipid type stored in lipid droplets of ovarian granulosa cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00660-5>

Zug, G. R., Vitt, L., & Caldwell, J. P. (2001). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic press.

Anexos

Anexo I

Tabla 1: Concentraciones de estradiol (E₂) y testosterona (T) (media $\pm$ desvío estándar) de nidos de *Caiman latirostris* provenientes de la naturaleza y semicautiverio.

Nido	Origen	Concentración E ₂ (ng/g)	Concentración relativa de T
1	Cautiverio	6,25 $\pm$ 1,92	1,29 $\pm$ 0,36
2	Cautiverio	4,28 $\pm$ 0,97	1,64 $\pm$ 0,47
3	Naturaleza	7,65 $\pm$ 2,84	1,60 $\pm$ 0,43
4	Naturaleza	10,91 $\pm$ 2,00	1,31 $\pm$ 0,05
5	Cautiverio	12,19 $\pm$ 2,56	1,30 $\pm$ 0,10
6	Naturaleza	8,48 $\pm$ 0,82	1,59 $\pm$ 0,35
7	Naturaleza	6,03 $\pm$ 1,90	1,67 $\pm$ 0,52
8	Naturaleza	4,66 $\pm$ 1,96	1,31 $\pm$ 0,18
9	Naturaleza	10,48 $\pm$ 4,12	1,61 $\pm$ 0,41
10	Naturaleza	5,69 $\pm$ 0,87	1,43 $\pm$ 0,25
11	Naturaleza	6,19 $\pm$ 1,67	1,29 $\pm$ 0,20
12	Naturaleza	10,19 $\pm$ 2,09	1,47 $\pm$ 0,14
13	Naturaleza	9,87 $\pm$ 1,71	1,3 $\pm$ 0,09
14	Naturaleza	7,53 $\pm$ 1,80	1,32 $\pm$ 0,27
15	Naturaleza	9,48 $\pm$ 5,30	1,63 $\pm$ 0,22
16	Naturaleza	5,61 $\pm$ 0,43	1,82 $\pm$ 0,38
17	Naturaleza	7,62 $\pm$ 3,95	1,77 $\pm$ 0,08

Tabla 2: Parámetros de los modelos lineales mixtos (GLMMs) con distribución beta para los ácidos grasos según su origen (naturaleza o semicautiverio). Se consideró cada ácido graso como variable dependiente, el lugar de origen como efecto fijo y los nidos como efecto aleatorio.

	Estimador	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
Intercepto 14:0	-6,61	0,12	-53,61	<2e-16
Origen (Naturaleza)	1,65	0,17	9,68	<2e-16
Intercepto 15:0	-7,40	0,14	-54,67	<2e-16
Origen (Naturaleza)	2,36	0,18	13,22	<2e-16
Intercepto 16:0	-1,31	0,01	-105,26	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-0,02	0,02	-1,030	0,304
Intercepto 16:1 n-7	-3,94	0,08	-51,30	<2e-16
Origen (Naturaleza)	1,03	0,11	9,59	<2e-16
Intercepto 16:1 n-9	-5,52	0,22	-25,31	<2e-16
Origen (Naturaleza)	0,96	0,30	3,16	0,0016
Intercepto 17:0	-6,21	0,09	-66,47	<2e-16
Origen (Naturaleza)	1,95	0,13	15,02	<2e-16
Intercepto 18:0	-2,75	0,03	-82,72	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-0,07	0,05	-1,44	0,151
Intercepto 18:1 n-7	-2,38	0,03	-81,04	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-1,13	0,04	-26,30	<2e-16
Intercepto 18:1 n-9	-0,84	0,05	-15,68	<2e-16
Origen (Naturaleza)	0,02	0,08	0,23	0,822
Intercepto 18:2 n-6	-0,80	0,01	-58,44	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-1,43	0,03	-57,00	<2e-16
Intercepto 18:3 n-3	-4,28	0,04	-115,85	<2e-16
Origen (Naturaleza)	1,21	0,05	23,32	<2e-16
Intercepto 20:0	-6,22	0,19	-32,55	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-0,20	0,27	-0,75	0,456
Intercepto 20:1 n-9	-5,97	0,04	-161,28	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-0,19	0,09	-3,15	0,0016

Intercepto 20:2 n-6	-6,03	0,12	-49,97	<2e-16
Origen (Naturaleza)	0,06	0,16	0,39	0,694
Intercepto 20:3 n-6	-5,50	0,07	-81,48	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-0,10	0,10	-1,00	0,316
Intercepto 20:3 n-3	-7,31	0,19	-39,53	<2e-16
Origen (Naturaleza)	1,27	0,24	5,26	1,47e-07
Intercepto 20:4 n-6	-0,75	0,06	-12,18	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-3,17	0,04	-77,87	<2e-16
Intercepto 20:5 n-3	-6,46	0,48	-13,54	<2e-16
Origen (Naturaleza)	0,69	0,56	1,22	0,221
Intercepto 22:5 n-6	-11,22	0,10	-107,86	<2e-16
Origen (Naturaleza)	1,21	0,14	8,54	<2e-16
Intercepto 22:6 n-3	-5,29	0,07	-71,87	<2e-16
Origen (Naturaleza)	1,21	0,10	11,82	<2e-16
Intercepto AGS	-5,86	0,02	-354,4	<2e-16
Origen (Naturaleza)	0,06	0,02	2,40	0,0166
Intercepto AGMI	-5,62	0,02	-258,16	<2e-16
Origen (Naturaleza)	0,25	0,03	8,09	5,81e-16
Intercepto AGPI	-5,65	0,03	-225,69	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-0,48	0,04	-13,09	<2e-16
Intercepto AGPI n-3	-8,52	0,07	-117,4	<2e-16
Origen (Naturaleza)	1,15	0,10	11,40	<2e-16
Intercepto AGPI n-6	-5,68	0,10	-594,90	<2e-16
Origen (Naturaleza)	0,79	0,02	-47,60	<2e-16
Intercepto n-6/n-3	-6,37	0,02	-321,20	<2e-16
Origen (Naturaleza)	-1,95	0,06	-34,80	<2e-16

El intercepto está representado por el semicautiverio. AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturado, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

^a $\sum AGS$: 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0.

^b $\sum AGMI$: 16:1 n-9 + 16:1 n-7 + 18:1 n-9 + 18:1 n-9 + 20:1 n-9.

^c $\sum AGPI$: 18:2 n-6 + 18:3 n-3 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:5 n-6 + 22:6 n-3.

^d $\sum AGPI$ n-3: 18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3.

^e $\sum AGPI$ n-6: 18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6.

^f $\sum n-6/\sum n-3$: (18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6)/(18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3).

Tabla 3: Parámetros y estadísticos de ajuste de los modelos lineal, cuadrático y aditivo generalizado (MAG) que relacionan niveles de estradiol (E₂) con el porcentaje de hembras

Componente	GLM lineal	GLM cuadrático	MAG
Intercepto	-2,04	186,94	55,29
E	7,32	-43,56	-
E ²	-	3,15	-
S(E)edf	-	-	2,87
s(E) p-valor	-	-	0,032
R ²	0,23	0,43	0,44
R ² ajustado	0,18	0,34	0,44
AIC	170,26	167,37	165,22

Tabla 4: Tamaño de postura, tamaño de los huevos (largo y ancho, media $\pm$ desvío estándar), peso (media $\pm$ desvío estándar) y porcentaje de hembras producidas en nidos de *Caiman latirostris*.

Nido	Tamaño de postura	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso huevos (g)	Porcentaje de hembras (%)
1	32	7,46 $\pm$ 0,40	4,00 $\pm$ 0,10	70,73 $\pm$ 1,41	60
2	26	6,53 $\pm$ 0,06	4,03 $\pm$ 0,06	61,60 $\pm$ 1,01	80
3	29	6,65 $\pm$ 0,22	4,17 $\pm$ 0,08	66,82 $\pm$ 3,37	20
4	32	6,26 $\pm$ 0,25	3,80 $\pm$ 0,12	52,1 $\pm$ 3,90	100
5	41	6,77 $\pm$ 0,19	4,30 $\pm$ 0,07	73,20 $\pm$ 1,60	100
6	29	6,08 $\pm$ 0,25	4,30 $\pm$ 0,05	66,17 $\pm$ 2,42	80
7	34	6,67 $\pm$ 0,07	4,40 $\pm$ 0,03	71,90 $\pm$ 1,30	40
8	35	6,52 $\pm$ 0,14	4,16 $\pm$ 0,06	67,50 $\pm$ 2,88	80
9	36	6,47 $\pm$ 0,19	4,02 $\pm$ 0,05	60,50 $\pm$ 1,35	80
10	26	6,51 $\pm$ 0,16	4,28 $\pm$ 0,07	71,66 $\pm$ 2,25	0
11	34	6,74 $\pm$ 0,29	4,23 $\pm$ 0,07	69,07 $\pm$ 2,77	40
12	38	6,23 $\pm$ 0,16	3,21 $\pm$ 0,09	57,20 $\pm$ 5,15	40
13	37	6,25 $\pm$ 0,06	4,10 $\pm$ 0,08	60,87 $\pm$ 2,66	100
14	31	6,63 $\pm$ 0,16	4,33 $\pm$ 0,10	70,66 $\pm$ 0,58	40
15	25	6,58 $\pm$ 0,09	4,36 $\pm$ 0,01	74,83 $\pm$ 2,50	80
16	27	6,56 $\pm$ 0,24	4,18 $\pm$ 0,02	68,06 $\pm$ 1,14	0
17	45	6,87 $\pm$ 0,21	4,27 $\pm$ 0,07	71,40 $\pm$ 3,50	0

Tabla 5: Regresiones lineales que relacionan los niveles de hormonas esteroides y porcentaje de hembras con las medidas morfométricas de los huevos de *Caiman latirostris*.

Variable X	Variable Y	a	b	R ²	Valor p
Peso huevos	T	1,95	0,0044	0,0225	0,5648
Peso huevos	Porcentaje de hembras	193,56	-2,08	0,1322	0,1514
Largo huevos	Concentración de E ₂	23,58	-2,396	0,1	0,2162
Largo huevos	Cantidad de E ₂	325,72	-19,69	0,0113	0,6844
Largo huevos	T	0,68	-0,04	0,0126	0,6687
Ancho huevos	T	0,38	0,27	0,0599	0,3438
Tamaño de postura	Porcentaje de hembras	114,31	-1,80	0,0793	0,2736

E₂: 17 β -estradiol; T: testosterona.

Tabla 6: Regresiones polinómicas de segundo grado que relacionan los niveles de hormonas esteroides y porcentaje de hembras con las medidas morfométricas de los huevos de *Caiman latirostris*.

Variable X	Variable Y	a	b	c	R ²	Valor p
Peso huevos	Concentración de E ₂	128,86	-3,69	2,47	0,3181	0,0685
Peso huevos	Cantidad de E ₂	2855,66	-84,63	0,67	0,2331	0,1559
Largo huevos	Porcentaje de hembras	3446,35	-979,74	70,42	0,173	0,2646
Ancho huevos	Concentración de E ₂	334,68	-252,07	30,24	0,1843	0,2403
Ancho huevos	Cantidad de E ₂	14549,10	-7003,60	857,30	0,1078	0,4499
Ancho huevos	Porcentaje de hembras	4151,0	-1927,0	226,2	0,1263	0,3886
Tamaño de postura	Concentración de E ₂	23,10	-0,81	0,01	0,0892	0,5205
Tamaño de postura	Cantidad de E ₂	943,43	-41,89	0,57	0,2223	0,1112
Tamaño de postura	T	3,19	-0,17	0,001	0,3002	0,0822

E₂: 17 β -estradiol; T: testosterona.

Anexo II

Tabla 7: Proporciones de ácidos grasos en la yema de los huevo de nidos de *Caiman latirostris* (media de % de FAME $\pm$ desvío estándar) de las temporadas estudiadas.

Ácidos grasos	2020	2021	2022	2023	Estadístico de prueba (χ^2)	Valor p
14:0	0,74 $\pm$ 0,24 ^b	0,75 $\pm$ 0,08 ^{bc}	0,95 $\pm$ 0,18 ^a	0,95 $\pm$ 0,10 ^{ac}	9,46	0,0241
15:0	0,60 $\pm$ 0,14	0,66 $\pm$ 0,16	0,51 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,07	4,61	0,2027
16:0	21,41 $\pm$ 0,70 ^b	21,14 $\pm$ 0,59 ^b	25,97 $\pm$ 2,02 ^a	25,56 $\pm$ 1,00 ^a	71,25	< 0,001
16:1 n-7	4,81 $\pm$ 0,72 ^b	6,82 $\pm$ 0,96 ^{bc}	10,36 $\pm$ 2,86 ^a	9,55 $\pm$ 0,45 ^{ac}	36,37	< 0,001
16:1 n-9	1,44 $\pm$ 0,18 ^a	0,49 $\pm$ 0,11 ^b	0,11 $\pm$ 0,04 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^d	1225,21	< 0,001
17:0	1,34 $\pm$ 0,28 ^a	1,23 $\pm$ 0,35 ^{ab}	0,91 $\pm$ 0,10 ^b	0,86 $\pm$ 0,09 ^b	14,59	0,0203
18:0	5,50 $\pm$ 0,09	6,06 $\pm$ 0,21	5,74 $\pm$ 0,60	5,55 $\pm$ 0,96	3,39	0,3358
18:1 n-9	31,25 $\pm$ 3,67 ^a	28,55 $\pm$ 2,04 ^{ab}	25,11 $\pm$ 3,56 ^b	27,68 $\pm$ 1,48 ^{ab}	11,13	0,0103
18:1 n-7	8,40 $\pm$ 0,21 ^b	8,24 $\pm$ 0,72 ^b	10,36 $\pm$ 1,56 ^a	10,64 $\pm$ 0,42 ^a	29,23	< 0,001
18:2 n-6	9,95 $\pm$ 0,43	9,26 $\pm$ 1,49	8,81 $\pm$ 2,68	8,80 $\pm$ 1,47	1,43	0,6976
18:3 n-3	3,92 $\pm$ 0,95 ^{ab}	4,58 $\pm$ 0,48 ^a	4,24 $\pm$ 0,58 ^{ab}	3,39 $\pm$ 0,66 ^b	8,54	0,0361
20:0	0,19 $\pm$ 0,04 ^a	0,10 $\pm$ 0,02 ^b	0,06 $\pm$ 0,01 ^c	0,04 $\pm$ 0,01 ^c	148,12	< 0,001
20:1 n-9	0,25 $\pm$ 0,03 ^b	0,22 $\pm$ 0,09 ^b	0,41 $\pm$ 0,10 ^a	0,45 $\pm$ 0,12 ^a	37,56	< 0,001
20:2 n-6	0,26 $\pm$ 0,11	0,21 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03	4,24	0,2366
20:3 n-6	0,36 $\pm$ 0,08 ^{ac}	0,43 $\pm$ 0,06 ^a	0,28 $\pm$ 0,04 ^b	0,32 $\pm$ 0,05 ^{bc}	24,74	< 0,001
20:4 n-6 (AA)	4,05 $\pm$ 0,49 ^b	3,82 $\pm$ 0,49 ^b	2,47 $\pm$ 0,27 ^a	2,41 $\pm$ 0,20 ^a	132,42	< 0,001
20:3 n-3	0,23 $\pm$ 0,10 ^a	0,30 $\pm$ 0,04 ^a	0,14 $\pm$ 0,02 ^b	0,12 $\pm$ 0,04 ^b	49,16	< 0,001
20:5 n-3 (EPA)	0,48 $\pm$ 0,15	1,19 $\pm$ 0,84	1,16 $\pm$ 0,46	0,80 $\pm$ 0,09	2,57	0,4270
22:5 n-6	0,44 $\pm$ 0,10 ^{ab}	0,63 $\pm$ 0,10 ^b	0,48 $\pm$ 0,12 ^{ab}	0,38 $\pm$ 0,11 ^a	13,98	0,0029
22:6 n-3 (DHA)	1,59 $\pm$ 0,33 ^{ab}	2,06 $\pm$ 0,42 ^b	1,25 $\pm$ 0,14 ^a	1,24 $\pm$ 0,24 ^a	29,67	< 0,001
ΣAGS^a	29,78 $\pm$ 0,88 ^a	29,94 $\pm$ 0,76 ^a	34,16 $\pm$ 2,56 ^b	27,96 $\pm$ 1,18 ^a	48,03	< 0,001
$\Sigma AGMI^b$	46,16 $\pm$ 2,96 ^{ab}	44,32 $\pm$ 1,38 ^b	46,35 $\pm$ 1,77 ^{ab}	48,31 $\pm$ 0,91 ^a	13,61	0,0347
$\Sigma AGPI^c$	21,27 $\pm$ 1,81 ^{ab}	22,55 $\pm$ 1,54 ^a	19,02 $\pm$ 2,26 ^b	17,62 $\pm$ 1,54 ^b	20,25	0,0002
$\Sigma AGPI\ n-3^d$	6,22 $\pm$ 1,34 ^{ab}	8,13 $\pm$ 1,64 ^a	6,80 $\pm$ 0,85 ^{ab}	5,55 $\pm$ 0,82 ^b	7,87	0,0125
$\Sigma AGPI\ n-6^e$	15,05 $\pm$ 0,56 ^a	14,42 $\pm$ 1,41 ^{ac}	12,23 $\pm$ 2,62 ^b	12,08 $\pm$ 1,29 ^{bc}	9,14	0,0275
$\Sigma n-6/\Sigma n-3^f$	2,52 $\pm$ 0,55	1,85 $\pm$ 0,42	1,86 $\pm$ 0,62	2,22 $\pm$ 0,43	4,79	0,1882

En negrita se destacan aquellos ácidos grasos en los que se obtuvieron diferencias ($p < 0,05$) y las letras indican diferencias entre temporadas. AA: ácido araquidónico, AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturado, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, DHA: ácido docosahexaenoico, EPA: ácido eicosapentaenoico.

^a ΣAGS : 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0.

^b $\sum AGMI$: 16:1 n-9 + 16:1 n-7 + 18:1 n-9 + 18:1 n-9 + 20:1 n-9.

^c $\sum AGPI$: 18:2 n-6 + 18:3 n-3 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:5 n-6 + 22:6 n-3.

^d $\sum AGPI$ n-3: 18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3.

^e $\sum AGPI$ n-6: 18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6.

^f $\sum n-6/\sum n-3$: (18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6)/(18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3).

Tabla 8: Parámetros de los modelos lineales mixtos (GLMMs) con distribución beta para los ácidos grasos de las diferentes temporadas estudiadas. Se consideró cada ácido graso como variable dependiente, la temporada como efecto fijo y los nidos como efecto aleatorio.

	Estimador	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
Intercepto 14:0	-14,14	0,07	-189,39	< 2e-16
Temporada 2021	0,05	0,09	0,58	0,5596
Temporada 2022	0,30	0,09	3,48	0,0005
Temporada 2023	0,31	0,09	3,32	0,0009
Intercepto 15:0	-5,13	0,11	-48,07	<2e-16
Temporada 2021	0,09	0,14	0,65	0,5170
Temporada 2022	-0,16	0,13	-1,16	0,2470
Temporada 2023	-0,11	0,15	-0,72	0,4690
Intercepto 16:0	-1,30	0,04	-36,91	<2e-16
Temporada 2021	-0,02	0,05	-0,36	0,7220
Temporada 2022	0,25	0,04	5,79	6,39e-9
Temporada 2023	0,23	0,05	4,73	2,20e-9
Intercepto 16:1 n-7	-2,99	0,12	-25,63	<2e-16
Temporada 2021	0,37	0,15	2,43	0,02
Temporada 2022	0,80	0,15	5,50	3,87e-08
Temporada 2023	0,74	0,16	4,56	5,05e-06
Intercepto 16:1 n-9	-4,23	0,12	-35,38	<2e-16
Temporada 2021	-1,08	0,17	-6,51	7,64e-11
Temporada 2022	-2,70	0,20	-13,25	<2e-16
Temporada 2023	-5,81	0,51	-11,39	<2e-16

Intercepto 17:0	-4,32	0,10	-42,74	<2e-16
Temporada 2021	-0,10	0,13	-0,74	0,4620
Temporada 2022	-0,38	0,13	-2,94	0,0032
Temporada 2023	-0,43	0,14	-2,98	0,0029
Intercepto 18:0	-2,84	0,05	-56,14	<2e-16
Temporada 2021	0,10	0,07	1,59	0,1120
Temporada 2022	0,04	0,06	0,68	0,5000
Temporada 2023	0,01	0,07	0,10	0,9170
Intercepto 18:1 n-7	-2,39	0,06	-42,41	<2e-16
Temporada 2021	-0,02	0,07	-0,33	0,7411
Temporada 2022	0,22	0,07	3,27	0,0010
Temporada 2023	0,26	0,08	3,44	0,0005
Intercepto 18:1 n-9	-0,79	0,08	-10,46	<2e-16
Temporada 2021	-0,13	0,10	-1,27	0,2029
Temporada 2022	-0,31	0,10	-3,22	0,0013
Temporada 2023	-0,17	0,11	-1,58	0,1138
Intercepto 18:2 n-6	-2,20	0,13	-17,50	<2e-16
Temporada 2021	-0,09	0,17	-0,53	0,6000
Temporada 2022	-0,17	0,16	-1,09	0,2760
Temporada 2023	-0,17	0,18	-0,94	0,3460
Intercepto 18:3 n-3	-3,22	0,09	-34,48	<2e-16
Temporada 2021	0,18	0,12	1,50	0,1350
Temporada 2022	0,10	0,12	0,85	0,3960
Temporada 2023	0,13	0,13	-1,20	0,2320
Intercepto 20:0	-6,26	0,08	-75,88	<2e-16
Temporada 2021	-0,71	0,11	-6,26	3,86e-10
Temporada 2022	-1,16	0,12	-10,12	<2e-16
Temporada 2023	-1,54	0,15	-10,17	<2e-16
Intercepto 20:1 n-9	-5,95	0,13	-44,90	<2e-16
Temporada 2021	-0,20	0,17	-1,16	0,2461
Temporada 2022	0,45	0,15	2,95	0,0031
Temporada 2023	0,56	0,17	3,35	0,0008

Intercepto 20:2 n-6	-6,01	0,15	-41,09	<2e-16
Temporada 2021	-0,17	0,19	-0,90	0,3704
Temporada 2022	-0,26	0,18	-1,40	0,1603
Temporada 2023	-0,41	0,21	-1,99	0,0465
Intercepto 20:3 n-6	-5,64	0,07	-78,33	<2e-16
Temporada 2021	0,20	0,09	2,19	0,0285
Temporada 2022	-0,24	0,09	-2,67	0,0075
Temporada 2023	-0,08	0,10	-0,78	0,4361
Intercepto 20:3 n-3	-6,10	0,11	-51,58	<2e-16
Temporada 2021	0,29	0,15	1,89	0,0582
Temporada 2022	-0,48	0,15	-3,22	0,0013
Temporada 2023	-0,61	0,17	-3,51	0,0004
Intercepto 20:4 n-6	-3,16	0,05	-67,34	<2e-16
Temporada 2021	-0,06	0,06	-1,01	0,3130
Temporada 2022	-0,51	0,06	-8,44	< 2e-16
Temporada 2023	-0,53	0,07	-7,74	9,94e-15
Intercepto 20:5 n-3	-5,34	0,45	-11,87	<2e-16
Temporada 2021	0,33	0,58	0,57	0,5690
Temporada 2022	0,84	0,55	1,52	0,1280
Temporada 2023	0,54	0,62	0,87	0,3850
Intercepto 22:5 n-6	-5,42	0,11	-47,96	<2e-16
Temporada 2021	0,36	0,14	2,48	0,0132
Temporada 2022	0,08	0,14	0,55	0,5816
Temporada 2023	-0,14	0,16	-0,89	0,3751
Intercepto 22:6 n-3	-4,13	0,09	-45,78	<2e-16
Temporada 2021	0,26	0,12	2,19	0,0286
Temporada 2022	0,24	0,11	-2,08	0,0378
Temporada 2023	-0,25	0,13	-1,98	0,0481
Intercepto AGS	-0,85	0,04	-22,68	<2e-16
Temporada 2021	0,01	0,05	0,16	0,8733
Temporada 2022	0,20	0,05	4,29	1,8e-05
Temporada 2023	-0,09	0,05	-1,71	0,0879

Intercepto AGMI	-0,15	0,03	-4,42	9,97e-06
Temporada 2021	-0,07	0,05	-1,64	0,1010
Temporada 2022	0,01	0,04	0,18	0,8540
Temporada 2023	0,08	0,05	1,82	0,0690
Intercepto AGPI	-1,31	0,06	-21,47	<2e-16
Temporada 2021	0,08	0,08	0,95	0,3428
Temporada 2022	-0,14	0,08	-1,86	0,0628
Temporada 2023	-0,25	0,09	-2,87	0,0042
Intercepto AGPI n-3	-2,73	0,10	-27,47	<2e-16
Temporada 2021	0,29	0,13	2,23	0,0260
Temporada 2022	0,11	0,13	0,86	0,3920
Temporada 2023	-0,12	0,14	-0,84	0,4030
Intercepto AGPI n-6	-1,73	0,09	-19,72	<2e-16
Temporada 2021	-0,05	0,12	-0,46	0,6467
Temporada 2022	-0,26	0,11	-2,33	0,0197
Temporada 2023	-0,27	0,12	-2,20	0,0276
Intercepto n-6/n-3	-3,67	0,14	-26,45	<2e-16
Temporada 2021	-0,32	0,18	-1,76	0,0784
Temporada 2022	-0,34	0,18	-1,91	0,0557
Temporada 2023	-0,13	0,20	-0,69	0,4932

El intercepto está representado por la temporada 2020. AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturado, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

^a $\sum AGS$: 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0.

^b $\sum AGMI$: 16:1 n-9 + 16:1 n-7 + 18:1 n-9 + 18:1 n-9 + 20:1 n-9.

^c $\sum AGPI$: 18:2 n-6 + 18:3 n-3 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:5 n-6 + 22:6 n-3.

^d $\sum AGPI$ n-3: 18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3.

^e $\sum AGPI$ n-6: 18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6.

^f $\sum n-6/\sum n-3$: (18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6)/(18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3).

Tabla 9: Asociaciones entre las temperaturas medias, la inversión de ácidos grasos en la yema de huevo y el porcentaje de hembras producidas en nidos de *Caiman latirostris* con la primera componente principal (CP1) y la segunda componente principal (CP2).

Variables	CP1	CP 2
%Hembras	-0,64	0,08
16:0	0,96	-0,11
16:1 n-7	0,92	0,17
16:1 n-9	-0,78	0,11
18:0	-0,05	0,57
18:1 n-7	0,75	-0,36
18:1 n-9	-0,79	-0,43
18:2 n-6 (AL)	0,46	0,25
18:3 n-3 (ALN)	0,03	0,73
20:4 n6 (AA)	-0,91	0,67
20:5 n3 (EPA)	0,46	0,67
22:6 n3 (DHA)	-0,48	0,58
Tmedia marzo	-0,32	-0,73
Tmedia abril	-0,74	-0,19
Tmedia septiembre	-0,82	0,19
Tmedia octubre	-0,71	0,03
Tmedia noviembre	-0,11	0,63

AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico; ALN: ácido linolénico; DHA: ácido docosaheptaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico. Tmedia: temperatura media

Tabla 10: Asociaciones entre las precipitaciones acumuladas, la inversión de ácidos grasos en la yema de huevo y el porcentaje de hembras producidas en nidos de *Caiman latirostris* con la primera componente principal (CP1) y la segunda componente principal (CP2).

Variables	CP1	CP 2
%Hembras	-0,56	0,05
16:0	0,93	-0,29
16:1 n-7	0,96	0,07
16:1 n-9	-0,81	0,01
18:0	0,04	0,52
18:1 n-7	0,72	-0,39
18:1 n-9	-0,82	-0,32
18:2 n-6	-0,52	-0,21
18:3 n-3	0,06	0,71
20:4 n-6 (AA)	-0,86	0,33
20:5 n-3 (EPA)	0,53	0,72
22:6 n-3 (DHA)	-0,41	0,82
PPT marzo	0,51	0,48
PPT abril	0,28	0,31
PPT septiembre	-0,45	0,49
PTT octubre	-0,42	-0,46
PPT noviembre	-0,81	-0,02

AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico; ALN: ácido linolénico; DHA: ácido docosahexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico. PPT: precipitaciones acumuladas.

Tabla 11: Asociaciones entre las variables climáticas (precipitaciones acumuladas y temperaturas medias), la inversión de hormonas esteroideas en la yema del huevo y el porcentaje de hembras producidas en nidos de *Caiman latirostris* con la primera componente principal (CP1) y la segunda componente principal (CP2).

Variables	CP1	CP 2
%Hembras	2,9x10 ⁻³	0,81
E₂	0,04	0,25
T	0,69	- 0,53
Tmedia marzo	0,91	-0,19
Tmedia abril	0,84	0,41
Tmedia septiembre	0,39	0,81
Tmedia octubre	0,20	0,79
Tmedia noviembre	-0,80	0,41
PPT marzo	-0,47	0,06
PPT abril	0,34	-0,31
PPT septiembre	0,78	0,04
PPT octubre	0,84	-0,29
PPT noviembre	0,90	0,42

E₂: 17β-estradiol; T: testosterona. PPT: precipitaciones acumuladas; Tmedia: se refiere a las temperaturas medias

Anexo III

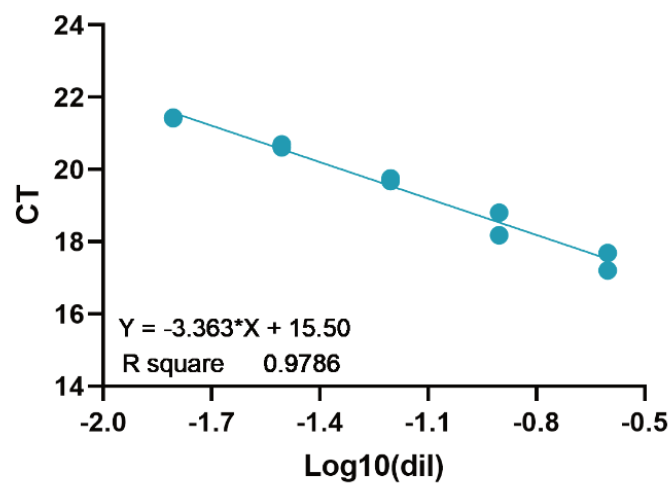


Figura 1: Curva de diluciones del gen *L8*. Analizamos las muestras con una dilución 1/16 para *L8*.

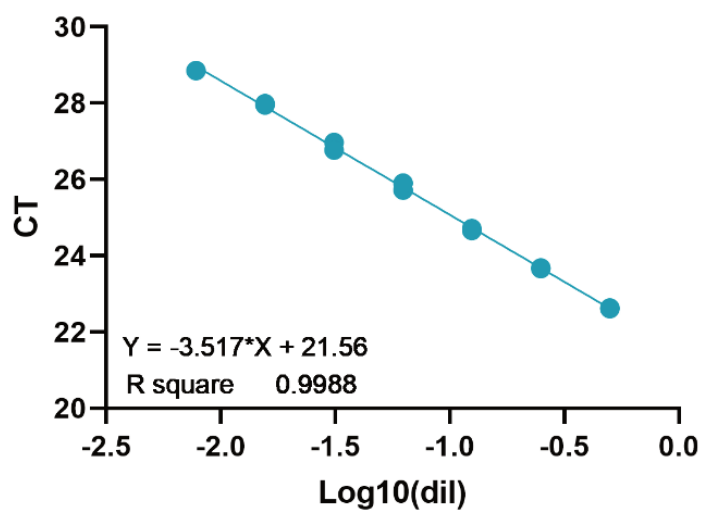


Figura 2: Curva de diluciones del gen *amh*. Analizamos las muestras con una dilución 1/4 para *amh*.

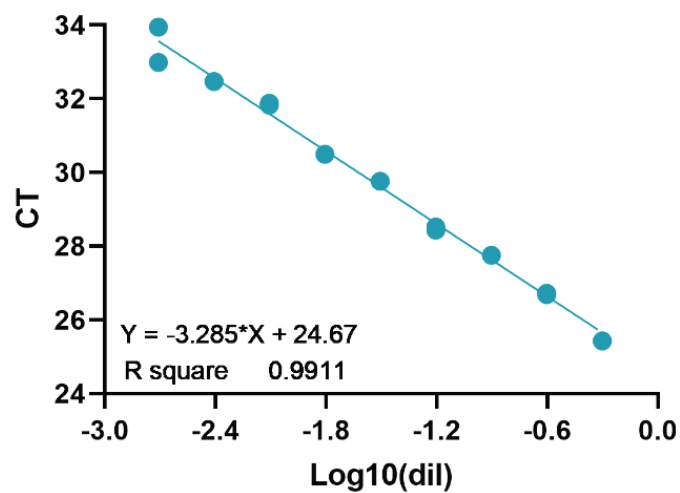


Figura 3: Curva de diluciones del gen *cyp19a1*. Analizamos las muestras con una dilución 1/2 para *cyp19a1*.

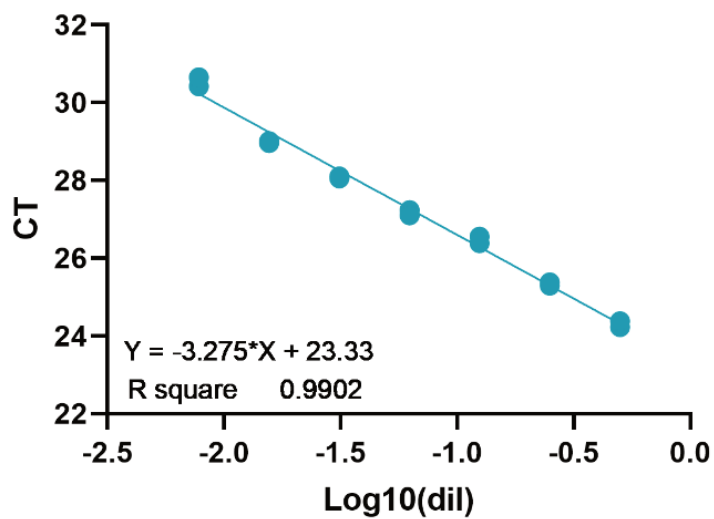


Figura 4: Curva de diluciones del gen *foxl2*. Analizamos las muestras con una dilución 1/2 para *foxl2*.

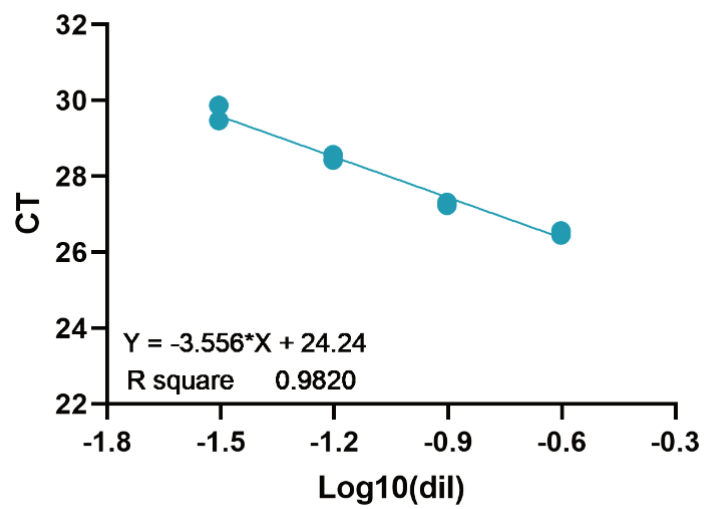


Figura 5: Curva de diluciones del gen *sox9*. Analizamos las muestras con una dilución 1/16 para *sox9*.

Tabla 11: Parámetros de los modelos lineales mixtos (GLMMs) con distribución beta para los ácidos grasos de los diferentes estadios del desarrollo embrionario analizados. Se consideró cada ácido graso como variable dependiente, el estadio como efecto fijo y los nidos como efecto aleatorio.

	Estimador	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
Intercepto 14:0	-9,36	0,07	-137,10	<2e-16
Estadio 19	0,01	0,03	0,35	0,7277
Estadio 21	0,03	0,03	0,19	0,2351
Estadio 24	-0,10	0,03	-3,42	0,0006
Intercepto 15:0	-5,28	0,22	-24,43	<2e-16
Estadio 19	-0,12	0,08	-1,50	0,1330
Estadio 21	-0,04	0,08	-0,47	0,6360
Estadio 24	-0,11	0,08	-1,27	0,2030
Intercepto 16:0	-1,17	0,05	-23,48	<2e-16
Estadio 19	-0,01	0,02	-0,50	0,6180
Estadio 21	-0,01	0,02	-0,41	0,6780
Estadio 24	0,01	0,02	0,53	0,5960
Intercepto 16:1 n-7	-7,08	0,10	-71,21	<2e-16
Estadio 19	-0,03	0,03	-1,25	0,2114
Estadio 21	-0,02	0,03	-0,70	0,4856
Estadio 24	-0,07	0,03	-2,47	0,0134
Intercepto 16:1 n-9	-6,15	0,30	-20,75	<2e-16
Estadio 19	0,29	0,17	1,73	0,0836
Estadio 21	0,04	0,18	0,24	0,8129
Estadio 24	-0,64	0,20	-3,11	0,0019
Intercepto 18:0	-7,44	0,02	-313,95	<2e-16
Estadio 19	0,06	0,01	1,78	0,0757
Estadio 21	0,06	0,01	3,87	0,0001
Estadio 24	0,09	0,01	6,46	1,08e-10
Intercepto 18:1 n-7	-2,27	0,05	-48,67	<2e-16
Estadio 19	<-0,01	0,02	-0,16	0,8705
Estadio 21	0,07	0,02	2,78	0,0054
Estadio 24	0,05	0,03	2,17	0,0298

Intercepto 18:1 n-9	-1,02	0,06	-17,56	<2e-16
Estadio 19	-0,01	0,02	-0,56	0,5740
Estadio 21	-0,04	0,02	-1,95	0,0510
Estadio 24	0,02	0,02	0,97	0,3330
Intercepto 18:2 n-6	-2,34	0,09	-26,32	<2e-16
Estadio 19	0,03	0,03	1,16	0,2450
Estadio 21	-0,01	0,03	-0,48	0,6280
Estadio 24	0,05	0,03	1,70	0,0900
Intercepto 18:3 n-3	-3,08	0,04	-82,70	<2e-16
Estadio 19	-0,01	0,02	-0,29	0,7746
Estadio 21	-0,06	0,02	-2,55	0,0107
Estadio 24	-0,09	0,02	-3,84	0,0001
Intercepto 20:0	-7,24	0,13	-57,35	<2e-16
Estadio 19	0,10	0,08	1,15	0,2483
Estadio 21	0,19	0,08	2,24	0,0253
Estadio 24	-0,02	0,09	-0,17	0,8621
Intercepto 20:1 n-9	-5,76	0,12	-47,94	<2e-16
Estadio 19	0,17	0,09	2,01	0,0445
Estadio 21	0,05	0,09	0,53	0,5944
Estadio 24	0,04	0,09	0,46	0,6473
Intercepto 20:2 n-6	-6,22	0,08	-77,06	<2e-16
Estadio 19	0,04	0,05	0,90	0,3680
Estadio 21	-0,05	0,05	-0,97	0,3330
Estadio 24	-0,07	0,05	-1,40	0,1610
Intercepto 20:3 n-6	-5,69	0,07	-79,92	<2e-16
Estadio 19	0,05	0,03	1,78	0,0750
Estadio 21	-0,07	0,03	-2,38	0,0172
Estadio 24	-0,11	0,03	-3,42	0,0006
Intercepto 20:3 n-3	-6,22	0,11	-56,25	<2e-16
Estadio 19	0,09	0,04	2,38	0,0174
Estadio 21	-0,06	0,04	-1,56	0,1196
Estadio 24	-0,14	0,04	-3,38	0,0007

Intercepto 20:4 n-6	-3,48	0,08	-45,55	<2e-16
Estadio 19	0,02	0,03	0,73	0,4660
Estadio 21	-0,11	0,03	-4,04	5,45e-05
Estadio 24	-0,15	0,03	-5,60	2,10e-08
Intercepto 20:5 n-3	-4,62	0,20	-22,84	<2e-16
Estadio 19	0,03	0,08	0,34	0,7323
Estadio 21	-0,08	0,08	-1,02	0,3080
Estadio 24	-0,26	0,09	-3,05	0,0023
Intercepto 22:5 n-6	-5,23	0,07	-75,11	<2e-16
Estadio 19	0,02	0,04	0,61	0,5446
Estadio 21	-0,10	0,04	-2,44	0,0147
Estadio 24	-0,21	0,04	-5,08	3,79e-07
Intercepto 22:6 n-3	-4,14	0,08	-50,65	<2e-16
Estadio 19	0,06	0,03	2,19	0,0284
Estadio 21	-0,05	0,03	-1,65	0,0988
Estadio 24	-0,12	0,03	-4,46	8,37e-06
Intercepto AGS	-0,79	0,04	-18,24	<2e-16
Estadio 19	<-0,01	0,02	-0,21	0,8360
Estadio 21	0,01	0,02	0,51	0,6110
Estadio 24	0,03	0,02	1,42	0,1390
Intercepto AGMI	-0,18	0,02	-10,59	<2e-16
Estadio 19	-0,02	0,01	-1,29	0,1960
Estadio 21	-0,01	0,01	-0,93	0,3540
Estadio 24	0,01	0,01	1,21	0,2280
Intercepto AGPI	-1,36	0,05	-26,20	<2e-16
Estadio 19	0,03	0,02	1,67	0,0950
Estadio 21	-0,07	0,02	-3,07	0,0021
Estadio 24	-0,07	0,02	-3,13	0,0018
Intercepto AGPI n-3	-2,54	0,05	-51,94	<2e-16
Estadio 19	0,01	0,02	0,34	0,7333
Estadio 21	-0,08	0,02	-3,45	0,0006
Estadio 24	-0,14	0,02	-6,09	1,16e-09

Intercepto AGPI n-6	-1,89	0,07	-26,21	<2e-16
Estadio 19	0,04	0,02	1,79	0,0737
Estadio 21	-0,05	0,03	-1,97	0,0484
Estadio 24	-0,02	0,02	-0,69	0,4976
Intercepto n-6/n-3	-4,00	0,09	-46,88	<2e-16
Estadio 19	0,01	0,03	0,37	0,7108
Estadio 21	0,01	0,03	0,52	0,6021
Estadio 24	0,10	0,03	3,84	0,0001

El intercepto está representado por la inversión materna. AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

^a $\sum AGS$: 14:0 + 15:0 + 16:0 + 18:0 + 20:0.

^b $\sum AGMI$: 16:1 n-9 + 16:1 n-7 + 18:1 n-9 + 18:1 n-7 + 20:1 n-9.

^c $\sum AGPI$: 18:2 n-6 + 18:3 n-3 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:5 n-6 + 22:6 n-3.

^d $\sum AGPI$ n-3: 18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3.

^e $\sum AGPI$ n-6: 18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6.

^f $\sum n-6 / \sum n-3$: (18:2 n-6 + 20:2 n-6 + 20:3 n-6 + 20:4 n-6 + 22:5 n-6) / (18:3 n-3 + 20:3 n-3 + 20:5 n-3 + 22:6 n-3).