

SEXO TERMO DEPENDENCIA Y SU RELACIÓN CON LA IDONEIDAD EN NEONATOS DE *PELTOCEPHALUS DUMERILIANUS* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

TEMPERATURE-DEPENDENT SEX DETERMINATION AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE SUITABILITY IN NEONATES OF *PELTOCEPHALUS DUMERILIANUS* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

Jaime De La Ossa V^{1*}, Richard C Vogt², Alejandro De La Ossa-Lacayo³

¹ Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo de Investigación en Biodiversidad Tropical. Calle 13ª N° 20-45, Apto.402, Edif. El Cairo, Sincelejo, Sucre Colombia. Email: jaimeslaossa@yahoo.com.

² Instituto Nacional de Pesquisas de Amazônia- INPA, Brasil.

³ CARSUCRE Subdirección de Gestión Ambiental, Colombia.

Recibido: Noviembre 16 de 2014

Aceptado: Noviembre 30 de 2014

*Correspondencia del autor, Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo de Investigación en Biodiversidad Tropical. Calle 13ª N° 20-45, Apto.402, Edif. El Cairo, Sincelejo, Sucre Colombia. Email: jaimeslaossa@yahoo.com

RESUMEN

En el presente trabajo se analizan y discuten los resultados de un ensayo de incubación a temperatura fija con huevos de *Peltocephalus dumerilianus* (Schweigger, 1812) obtenidos mediante inducción hormonal de ocho hembras de las cuales se logró un total de 79 huevos; se reafirma la existencia de sexo termo dependencia para la especie, con el nacimiento de 45 machos y 11 hembras; también se discuten las relaciones existentes entre la morfometría de las hembras y las medidas de los huevos y nidadas, estableciéndose una relación significativa entre volumen total de los huevos por hembra con su morfometría. Se Comparan las medidas morfométricas para el grupo de neonatos obtenidos y mantenidos en un ensayo de crecimiento durante nueve meses en el laboratorio, donde se halló que solamente existe diferencia significativamente para ancho de la cabeza y peso en relación con el sexo, y se valida la que la sexo termo dependencia posee valor de idoneidad para esta especie.

Palabras clave: Sexo termo dependencia, alometría, proporción sexos, *Peltocephalusdumerilianus*, Brasil.

ABSTRACT

The present study analyzed the results and discussed the controlled incubation at constant temperatures with eggs of *Peltocephalus dumerilianus*(Schweigger, 1812) obtained by hormonal induction of eight females that obtained a total of 79 eggs; the sexual thermal dependence is reaffirmed for the species, with the birth of 45 males and 11 females; the relationships between the morphometric of the females and the measures of the eggs and clutch size are also discussed. A significant relationship is established between the total volume of the eggs for female with the morphometrics variables. Measures are compared in the group of obtained hatchlings and maintained in a growth test for nine months in the laboratory, in which significant differences for the head wide and weight in relation with the sex were found, and it is evidenced that Temperature-dependent sex determination possesses suitability value for this species

Keywords: : Temperature-dependent sex determination, allometric, sex relation, *Peltocephalusdumerilianus*, Brazil

INTRODUCCIÓN

La determinación sexual es un proceso biológico fundamental de profunda importancia para el desarrollo individual y la formación de las relaciones entre sexos en poblaciones naturales (1). Para algunas especies de reptiles ocurre determinación sexual genética (DSG) y en otras se da determinación sexual por temperatura (STD) (*sexual thermal determination*) (2, 3, 4). En quelonios con STD, el patrón usual implica que a temperaturas bajas de incubación se producen machos y a temperaturas altas de incubación se obtienen hembras (5, 6, 7). No obstante, para algunas especies de quelonios el patrón de STD manifiesta que a temperatura baja y alta de incubación se producen hembras y a temperaturas medias de incubación se da como resultado machos (3,8).

Adicionalmente es necesario tener en cuenta que existe un primer período de sensibilidad, que es aquel durante el cual el sexo es irreversiblemente fijado y las subsecuentes temperaturas de incubación no son relevantes (7). La extensión del primer período de sensibilidad dependerá de la temperatura de incubación que se tenga (7). Como consecuencia del efecto acumulativo de la temperatura de incubación en la determinación sexual, las temperaturas previas al primer período de sensibilidad influyen la determinación sexual, pero no irreversiblemente, reconociéndose este estadio como segundo período de sensibilidad (7). Existe una temperatura crítica (9) o temperatura pivotal (10) o temperatura umbral (11), que es justamente en la que se producen en igual proporción ambos sexos, la cual varía entre especies y entre poblaciones de la misma especie de diferentes áreas geográficas (12, 13, 14, 15, 16).

La determinación sexual en el embrión y la determinada durante el segundo tercio del período de incubación están relacionadas con los efectos aditivos de la temperatura previamente presente, ya que durante el período de incubación se requieren por lo menos cuatro horas diarias de la temperatura seleccionada: superior o inferior, teniendo como referencia la temperatura umbral para que se obtengan machos o hembras preferencialmente (17).

En los quelonios debido a múltiples factores, entre ellos: largos períodos de vida y madurez tardía, no permiten comprobar fácilmente si algunos días de más o de menos durante la incubación resultarían en mejores ventajas para la población, esto hace que STD, en este caso, se considere un enigma evolutivo (18) y muchos

aspectos de su funcionamiento y utilidad no son claros todavía, requiriéndose por lo tanto profundizar en su investigación (19).

Además del efecto de crecimiento, la temperatura de incubación afecta el rendimiento en reptiles (20, 21). Hipotéticamente se propone que la significancia adaptativa de STD, puede expresarse para reptiles como una ventaja evolutiva que se relacionaría con aspectos tales como: inercia filogenética, lo cual indicaría que se trata de una forma ancestral de determinación sexual sin significancia adaptativa, que actuaría en la adaptación de grupo, siendo una estrategia que facilita la dinámica interna, que puede actuar reduciendo la posibilidad de entrecruzamiento nocivo, pero no explica de forma clara el caso de aquellos organismos iteroparous de larga vida, como los quelonios que presentan cohortes interreproductivas anuales (3, 18).

Se Considera que las opciones diferenciales forman la propuesta más robusta de todas las existentes hasta ahora: expresan que la temperatura de incubación afecta la idoneidad de machos y hembras al nacer, entonces STD puede elevar el valor de idoneidad para permitir el desarrollo del embrión en las mejores condiciones de incubación (5, 6, 22, 23, 24, 25, 26). Igualmente, se puede interpretar que STD afecta directamente el fenotipo y las posibilidades de desarrollo óptimo del individuo (27).

En los Podocnemididae del Amazonas se ha comprobado la existencia de STD en *Podocnemis unifilis*, *P. erythrocephala*, *P. expansa*, *P. sextuberculata* y *Peltocephalus dumerilianus* (28, 29, 30, 31, 32). En el presente estudio se tuvo como objetivo probar una temperatura de incubación que produjera más machos que hembras bajo manejo controlado, al tiempo que se estableció el crecimiento de los neonatos en el laboratorio, su dimorfismo sexual y la relación de estos factores con STD; se discuten igualmente las relaciones morfométricas de las hembras inducidas respecto de los huevos y nidada obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los huevos destinados a la incubación en el laboratorio, se trabajó con inducción de hembras grávidas, capturadas en medio natural entre octubre 25 y noviembre 5 de 2004 en el río Itú, municipio de Barcelos, Amazonas, Brasil (00°24'10'' S - 63°27'36'' O y 00°24'39'' S - 63°26'05'' O). Para establecer la

gravidez, se realizó palpación inguinal (32). Para cada una de las ocho hembras seleccionadas, se tomaron las siguientes medidas en línea recta: largo del carapax (LC cm), ancho del carapax (AC cm), largo del plastrón (LP cm), altura del animal (A cm), y peso (P gr) (33, 34). Para los registros de peso se usaron balanzas de precisión (Pesola® 1 Kg y 30 Kg \pm 0,5 g). Para las medidas regla pediátrica (1 - 100 cm \pm 0,1 cm) y calibrador digital 0 - 200 mm (Mitutoyo® IP 66 \pm 0,01 mm).

La obtención de los huevos se realizó en el laboratorio de la Fundación Rio Negro Lodge (Barcelos, Amazonas). Cada hembra fue alojada en una caja plástica, con nivel de agua que les permitiera ascender a la superficie para respirar, sin que pudieran nadar, manteniendo una temperatura constante de 28 °C durante todo el proceso, para lo cual se instaló en cada caja un calentador eléctrico (Newattino®); se llevaron registro continuo de temperatura mediante el uso de termómetro digital (C/MEM B3 – Termomed® - 10 a + 60 °C \pm 0,1°C). Pasado un período de aclimatación de 12 horas, se inyectó subcutáneamente 10 UI de oxitocina sintética® por kg de peso corporal (32).

Los huevos obtenidos fueron marcados individualmente; medidos en su largo total (X) y diámetro (Y), usando calibrador electrónico (Mitutoyo® IP 66 \pm 0,01 mm); también fueron pesados con balanza electrónica digital portátil (Kenex 500 TS® \pm 0,1gr) (32, 35) y se calculó el volumen unitario y total de cada grupo o nidada (33).

La incubación fue realizada en cuarto con aire acondicionado permanente, como cámara de incubación se utilizó una caja térmica plástica y como fuente de calor y distribución de temperatura un termostato (Climastac®) y una bomba de aireación de acuario (Aquaclear®) (32). La temperatura de incubación total fue de 30,16 °C (28,6 - 31,5) y la temperatura de incubación durante el período de sensibilidad fue de 29,73 °C (28,93 - 30,83). Los registros de temperatura durante la incubación se tomaron con data loggers (Hobo®); la humedad ambiental en la cámara de incubación se mantuvo a saturación durante todo el ensayo (36).

Los neonatos fueron medidos mensualmente durante todo el experimento de crecimiento en el laboratorio, tomándose: largo del carapax (LC cm), ancho del carapax (AC cm), Largo del plastrón (LP cm), altura del animal (A cm), ancho de la cabeza (AK) y peso (P gr) (34, 35); se les marcó en las placas marginales mediante cortes (37, 38), además de identificarlos con el número

correspondiente pintado en la parte superior del carapax con tinta indeleble no tóxica.

Los neonatos fueron mantenidos en bandejas plásticas de 55 cm de largo, 35 cm de ancho y 19 cm de profundidad (0,1925 m² de área y 0,382 m³ de volumen). Se mantuvo una dieta a base de alimento concentrado comercial para perro, tres veces a la semana, equivalente al 8% de su masa corporal semanal, con cambio de agua 6 veces al mes, manteniendo una temperatura ambiente media de 26,9 °C.

Para la verificación del sexo los animales fueron sacrificados a los diez meses de edad mediante inyección de fenobarbital de sodio, se les abrió por el puente para exponer la cavidad abdominal, se les fijó en formol tamponado al 10%, y se conservaron en alcohol al 70%, luego se les depositó en la colección del Instituto Nacional de Pesquisas de Amazonas- INPA, para luego observar diferencias gonadales al microscopio (39).

La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de ajuste de Kolmogorov- Smirnof e inspección visual de las figuras de distribución normal acumulada; los análisis estadísticos incluyeron X², regresión múltiple y análisis de factor discriminante (40). Los Análisis de sexotermodependencia fueron hechos mediante la observación de gráficos de temperatura diaria en relación con el número de días de incubación.

RESULTADOS

Se obtuvo un total de 79 huevos provenientes de ocho hembras inducidas, con un rango de siete a 13 huevos/hembras (\bar{x} = 9,87); en promedio presentaron: 56,65 mm (48,62- 62,46. DS=2,401) de largo, 34,52 mm (31,53-36,91. DS=1,585) de diámetro y 35,25 cc (28,11- 40,78. DS=3,32) de volumen (Tabla 1); en cuanto al peso de los huevos, se halló una media de 38,72 g (32,5 - 43,7. DS = 2,815) (Tabla 2).

Tabla 1. Calculo de volumen en cc para huevos y nidadas de *P. dumerilianus*. (Fuente: Presente estudio)

Hembra	Huevos	Media	DS	Min.	Max.	Total Vol.
1	8	30,63	1,15	29,31	32,88	245,05
2	7	32,44	0,95	31,47	34,36	227,09
3	9	38,36	1,75	35,52	40,56	345,24
4	7	37,71	1,18	35,45	38,67	264,00
5	13	38,06	1,28	35,60	40,78	494,82
6	12	30,93	1,65	28,11	33,35	371,24
7	10	36,92	0,94	35,77	38,56	369,22
8	13	36,92	2,00	33,19	39,79	480,06

Tabla 2. Peso en gramos de huevos y nidadas obtenidas para *P. dumerilianus*. (Fuente: Presente estudio)

Hembra	1	2	3	4	5	6	7	8
Media	35,45	37,30	37,47	38,10	40,97	35,46	41,27	41,52
Min.	32,60	35,70	36,30	36,80	38,00	32,50	38,20	37,10
Max.	37,20	40,20	38,40	38,90	43,00	38,30	43,20	43,70
DS	1,329	1,431	0,632	0,772	1,294	1,726	1,631	1,665
Total	283,60	261,10	337,23	266,7	532,48	425,52	412,7	539,63

Al relacionar mediante un test de regresión múltiple las medidas morfométricas de las hembras (Tabla 3) con el número de huevos y con el volumen total de cada nidad, se pudo establecer que hubo relación significativa entre volumen total de los huevos por hembra con largo del carapax (LC), largo de plastrón (LP) y A (Altura) (F (5,73)=32,112 p<0,05 R²=0,6874); no se hallaron valores significativos para el número de huevos al compararlo con las mismas variables expuestas.

Tabla 3. Morfometría de las hembras de *P. dumerilianus* inducidas (Largo del carapax (LC), ancho del carapax (AC), largo del plastrón (LP), altura (A), y (P) peso). (Fuente: Presente estudio)

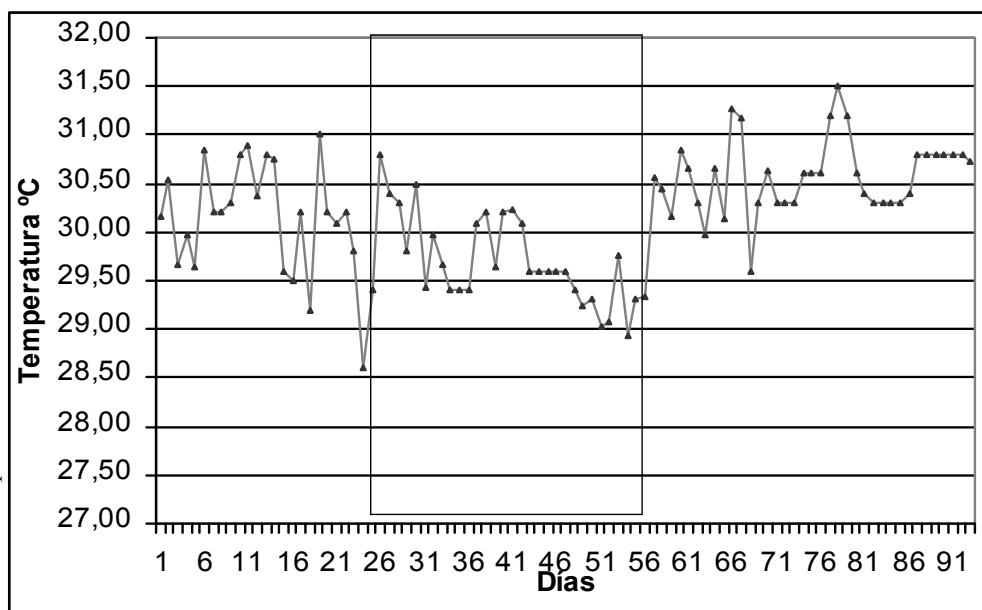
Estadístico	LC (cm)	AC (cm)	LP (cm)	A (cm)	P (g)
Media	32,88	23,23	26,02	12,97	4646,8
Min.	29,90	20,50	23,10	10,00	3200,0
Max.	34,50	25,20	27,20	14,20	5800,0
DS	1,354	1,433	1,382	1,173	856,3

En cuanto al peso total de los huevos comparado con el peso total de las hembras ovadas y sin huevos, se determinaron valores significativos en la regresión múltiple aplicada (F (2,5)=332, p<005 R²=0,9998). La incubación total conducida con una media de 30,16°C

(28,6-31,5. DS=0,60042) tuvo una duración de 97 días (96-98); tomando como período de sensibilidad del día 31 al día 60, que equivale al segundo tercio del tiempo total de incubación, la temperatura media en este lapso fue de 29,73 °C (28,93-30,83. DS=0,4891) (Figura 1).

Los neonatos producidos en este proceso de incubación presentaron determinación sexual por temperatura (STD); de los 79 huevos incubados eclosionaron 56 crías (70,88%), 45 machos y 11 hembras, con una proporción de machos equivalente a 80,37%, siendo altamente significativo el número de machos (X² =20,64. Gl 1, p<0,01). La relación entre sexos se mantuvo durante todo el experimento (75,77% de machos) (X² =18,36. Gl 1, p<0,01). Morfométricamente los neonatos presentaron en mm: LC = 51,22 (41,4-54,4), AC = 40,61 (32,1-45,3), LP = 42,08 (38,0-46,2), AP = 30,32 (20,2-34,4), A = 24,38 (22-27,2), AK= 13,86 (12,57-15,86), y P = 31,37g (26,4-34,8). Al comparar mediante análisis discriminante las medidas morfométricas del experimento de crecimiento para los nueve meses, se consiguió establecer que solamente existe diferencia significativamente para ancho de la cabeza (AK) y peso (P) en relación con el sexo (F (9,408)=3,587, p< 0,05).

Figura 1. Temperatura de incubación en relación con la duración del proceso y cuadro que señala el período de sensibilidad para *P. dumerilianus*.



DISCUSIÓN

El tamaño de la nidada concuerda con los datos existentes para la especie (32, 41, 42). En cuanto a las medidas de los huevos se encuentran dentro del ámbito establecido para *P.dumerilianus* (39, 41, 42), pero el peso registrado fue menor. La duración de la incubación en el laboratorio coincide con lo señalado para la especie (32, 41), pero fue 22% menor que lo establecido por Vogt *et al.* (39) y 18,9% menor que lo reportado por Félix-Silva (42), en ambos casos se hace referencia a incubación natural.

La menor hembra madura encontrada presentó un largo de carapax (LC) y peso mayor que lo registrado por Vogt (32) para el río Negro, Brasil. En general el tamaño de la hembra presenta relación significativa con el volumen total de la nidada, igualmente existe relación directa entre la masa total de la nidada y la masa corporal de la hembra (42). La tasa de eclosión se presenta similar a la descrita por Félix-Silva (42) quien halló un valor del 50% al 95%, pero es mayor a la obtenida por Vogt *et al.* (39), en ambos casos para medio natural. Se puede resaltar que se presentó determinación sexual por la temperatura de incubación (32), ya que durante el período de sensibilidad se mantuvo una temperatura media de 29,73 °C (28,93-30,83) para producir significativamente 80,37% de machos, siendo las altas temperaturas las que favorecieron los resultados obtenidos.

Para los neonatos las medidas de largo del carapax (LC) y peso coinciden con los datos existentes para *P. dumerilianus* (32, 41). Durante los 270 días del experimento de crecimiento, se halló diferencia significativa solamente para el ancho de la cabeza (AK) y el peso (P), con relación al sexo, lo que se presenta como una expresión fenotípica de la especie, que comienza a manifestarse de manera temprana, diferenciando a los machos, que en esta especie son de mayor tamaño corporal que las hembras (41).

En este estudio no se evidenciaron respuestas adaptativas unidas a STD, la diferencia significativa de sexos producidos, siendo mayor la proporción de machos, se

puede interpretar como una elevación del valor de idoneidad en la incubación (5, 6, 22, 23, 24, 25, 26). Al comparar se tiene que los resultados encontrados para machos de *Chelydra serpentina* producidos en el laboratorio mediante manejo de STD (24), muestran un mayor crecimiento; los machos de *C. serpentina* aparentemente compiten agresivamente para posibilitar la reproducción lo que demuestra que hay relación con sexo y tamaño corporal (43). Este tipo de comportamiento reproductivo del macho también caracteriza a *P. dumerilianus*, hallándose una asociación entre sexo y alometría (44) que permitiría conceptuar que si existe, en este sentido, elevación del valor de idoneidad.

Se puede afirmar que la sobrevivencia obtenida en relación al sexo fue independiente de STD, porque durante la totalidad del estudio la proporción sexual fue significativamente similar. Fue evidente que la sobrevivencia no estuvo relacionada con el sexo, ni con la temperatura de incubación, ni con las condiciones de manutención; adquieren, entonces, mayor valor los factores individuales (44).

En este caso, según los resultados se interpreta que STD fue selectiva en cuanto a la proporción de machos conseguida, pero la ausencia de un determinado rendimiento medible en función del sexo no permite aseverar que exista relación al respecto con la temperatura de incubación. Se puede establecer que existe favorecimiento para uno de los sexos por la temperatura de incubación, lo que permite aceptar que STD, en este ensayo solo presentó valor de idoneidad (5, 11, 22, 23, 24, 25, 26; 27).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas -FAPEAM por la financiación del proyecto, a la Fundación Rio Negro Lodge por el apoyo logístico ofrecido durante las faenas de campo, a todos y cada uno de los moradores del área de estudio por el apoyo y guía recibida durante el tiempo que se compartió con ellos.

BIBLIOGRAFÍA

1. West SA., Reece SE, Sheldon BC. Sex ratios. *Heredity* 2002; 88: 117-124.
2. Sites JWJ., Bickham JW, Haiduk MW. Derived X chromosome in the turtle genus *Staurotypus*. *Science* 1979; 206: 1410-1412.
3. Ewert MA., Nelson CE. Sex determination in turtles: patterns and some possible adaptive values. *Copeia* 1991; 1: 50-69.
4. Sarre DS., Georges A, Quinn, A. The ends of a continuum: genetic and temperature dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 2004; 26: 639-645.
5. Charnov EL., Bull JJ. When is sex environmentally determined?. *Nature* 1977; 266: 828-830.
6. Bull JJ., Vogt RC. Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science* 1979; 206: 1186-1188.
7. Bull JJ., Vogt RC. Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. *The Journal of Experimental Zoology* 1981; 218: 435-440.
8. Ewert MA., Jackson DR, Nelson CE. Patterns system of temperature sex determination in turtles. *The Journal of Experimental Zoology* 1994; 270: 3-15.
9. Pieau C. Données recentes sur la différenciation sexuelle en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Cheloniens). *Bulletin de la Société Zoologique de France* 1976; 4: 46-53.
10. Yntema CL., Mrosovsky N. Critical periods and pivotal temperature for sex determination in loggerhead sea turtle. *Canadian Journal of Zoology* 1982; 60: 1012-1016.
11. Bull JJ. Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology* 1980; 55: 3-20.
12. Bull JJ., Vogt RC, McCoy CJ. Sex determining temperatures in turtles: a geographic comparison. *Evolution* 1982; 36: 326-332.
13. McCoy CJ., Vogt RC, Censky EJ. Temperature controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetology* 1983; 17: 404-406.
14. Limpus CJ., Reed P, Miller JD. Temperature dependent sex determination in Queensland sea turtles: intra-specific variation in *Caretta caretta*. In: Grigg G, Shine R, Ehmann H. (Eds.). *Biology of Australian Frogs and Reptiles*. Royal Zoological Society. New South Wales, Australia; 1985: 343-351.
15. Mrosovsky N. Pivotal temperature for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from northern and southern beaches. *Canadian Journal of Zoology* 1988; 66: 61-669.
16. Vogt RC., Flores-Villela O. Effects of incubation temperature on sex determination in a community of Neotropical freshwater turtles in southern México. *Herpetologica* 1992; 48: 265-270.
17. Vogt RC. Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. *Chelonian Conservation and Biology* 1994; 1 (2): 159-162.
18. Shine R. Why is sex determined by nest temperature in many reptiles?. *Tree* 1999; 14 (5): 186-189.
19. Bowden RM., Ewert MA, Nelson CE. Environmental sex determination in a reptile varies seasonally and with yolk hormones. *Proceedings of the Royal Society* 2000; B-267: 1745-1749.
20. Janzen FJ. An experimental analysis of natural selection on body size of hatchling turtles. *Ecology* 1993; 74: 332-341.
21. Freedberg S., Ewert MA, Nelson CE. Environmental effects on fitness and consequences for sex allocation in a reptile with environmental sex Determination. *Evolutionary Ecology Research* 2001; 3: 953-967.
22. Janzen FJ., Paukstis GL. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution and experimental design. *The Quarterly Review of Biology* 1991; 66: 149-179.
23. Burke RL. Adaptive value of sex determination mode and hatchling sex-ratio bias in reptiles. *Copeia* 1993; 1: 854-859.
24. Rhen T., Lang JW. Phenotypic plasticity for growth in the common snapping turtle – effects of incubation-temperature, clutch, and their interaction. *The American Naturalist* 1995; 146: 726-747.
25. Shine R., Elphick MJ, Harlow PS. Sisters like it hot. *Nature* 1995; 378: 451-452.
26. St. Juliana JR., Bowden RM, Janzen FJ. The impact of behavioral and physiological maternal effects on offspring sex ratio in the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 2004; 56: 270-278.

27. Warner DA., Shine R. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination: experimental tests with a short-lived lizard. *Evolution* 2005; 59 (10): 2209-2221.
28. Alho CJR. Conservation and management strategies for commonly exploited amazonian turtles. *Biological Conservation* 1985; 32 (2): 291-298.
29. Remor de Souza R., Vogt RC. Incubation temperature influence sex and hatchling size in the Neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. *Journal of Herpetology* 1994; 28 (4): 453-464.
30. Valenzuela N., Botero R, Martínez E. Field study of sex determination in *Podocnemis expansa* from Colombian Amazonia. *Herpetologica* 1997; 53: 390-398.
31. Valenzuela N. Constant, shift, and natural temperature effects on sex determination in *Podocnemis expansa* turtles. *Ecology* 2001; 82 (11): 3010-3024.
32. Vogt RC. Turtles of Rio Negro. In: Chao NL, Petry P, Prang G, Sonneschien L, Tlusty M. (Eds.). Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro Basin, Amazonia. Brazil Project Piaba. Ed. Universidade do Amazonas. Manaus, Brasil; 2001: 245-262.
33. Vanzolini PE. A brief biometrical note on the reproductive biology of some South American *Podocnemis* (Testudines, Pelomedusidae). *Papeis Avulsos de Zoologia* 1977; 31 (5): 79-102.
34. Seidel ME. Revision of the West Indian Emydid turtles (Testudines). *American Museum Novitates* 1988; 2918: 1-41.
35. Medem F. Recomendaciones respecto a cómo contar escamado y tomar dimensiones de nidos, huevos y ejemplares de los Crocodylia y Testudines. *Lozania* 1976; 20: 1-17.
36. De La Ossa VJ. Guías académicas para zootecnia, con énfasis en reptiles. Universidad de Sucre. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Depto. Zootecnia. Sincelejo, Sucre; 1999.
37. Zweifel RG. Long-term ecological studies on population of painted turtle, *Chrysemys picta* on Long Island, N.Y. *American Museum Novitates* 1989; 2952: 1- 55.
38. Gibbons JW. Recommendations for future research on freshwaters turtles: What are the question?. In: Gibbons JW. (Ed.). Life history of the slider turtle. Smiths. Inst. Press. Washington, D.C. USA; 1990: 311-317.
39. Vogt RC., Cantarelli VC, De Carvalho GA. Reproduction of the Cabeçudo, in the Biological Reserve of Rio Trombetas, Pará, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology* 1994; 1 (2): 145-148.
40. Zar JH. Bioestatistical analysis. Third edition. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliff; 1996.
41. Medem F. La Reproducción De La Tortuga “cabezón” *Peltocephalus tracaxa* (Spix). 1924 (Testudines. Pelomedusidae) en Colombia. *Lozania* 1983; 41: 1-12.
42. Félix-Silva D. Ecologia Reprodutiva do “Cabeçudo” (*Peltocephalus dumerilianus*) Testudines: Pelomedusidae, no Parque Nacional do Jaú, Amazonas. Dissertação de Mestrado. UERJ/RJ. Rio de Janeiro, Brasil; 2004.
43. Janzen FJ., O’Steen S. An instance of male combat in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Bulletin of Chicago Herpetological Society* 1990; 25: 11-19.
44. Fairbairn DJ. Allometry for sexual size dimorphism: Pattern and Process in the Coevolution of Body Size in Males and Females. *Annual Review of Ecological Systems* 1997; 28: 659-687.
45. Mangel M., Stamps J. Trade-offs between growth and mortality and the maintenance of individual variation in growth. *Evolutionary Ecology Research* 2001; 3: 583-593.