



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LOS RECURSOS
NATURALES PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
ECOLOGÍA INTEGRATIVA**

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ESTRÉS ASOCIADO A LAS
MEDIDAS DE CONSERVACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA HORMONA
LIBERADORA DE CORTICOTROPINA EN EL CEREBRO DE CRÍAS DE
TORTUGA GOLFINA**

TESIS DE MAESTRÍA

MVZ. GUADALUPE DELGADO MEZA

ASESORA: ALMA LILIA FUENTES FARÍAS
COASESORA: DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA

Morelia, Michoacán. Abril 2017



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LOS RECURSOS
NATURALES PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
ECOLOGÍA INTEGRATIVA**

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ESTRÉS ASOCIADO A LAS
MEDIDAS DE CONSERVACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA HORMONA
LIBERADORA DE CORTICOTROPINA EN EL CEREBRO DE CRÍAS DE
TORTUGA GOLFINA**

TESIS

MVZ. GUADALUPE DELGADO MEZA

ASESORA: DRA. ALMA LILIA FUENTES FARÍAS

COASESORA: DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA

Morelia Michoacán. Abril 2017

AGRADECIMIENTOS.

- *Primero que nada agradezco a mis padres Miguel Delgado Castro y Ma. Guadalupe Meza Sánchez por darme la vida y la oportunidad de estudiar para crecer como persona, los cuales son mi más grande admiración y fortaleza.*

- *De igual forma a mis hermanas y hermanos María, Salud, Azucena, Yolanda, Eva, Fernando, Miguel, Jesús y Patricia, que siempre han estado con mígo apoyándome y dándome aliento para no rendirme.*

- *También quiero agradecer a mis amigos que siempre estuvieron con mígo en los buenos y malos momentos, además de que aprendí mucho de cada uno: Nancy, Arturo, Edel y Oscar.*

- *A mí asesora Alma Lilia Fuentes Farías y co-asesora Esperanza Meléndez Herrera que siempre me apoyaron en cada una de las etapas de esta maestría.*

Índice

1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	3
2.1.	Tortugas Marinas.....	3
2.2.	Características de la tortuga <i>Lepidochelys olivacea</i>	3
2.3.	Amenazas y conservación de las tortugas marinas.....	4
2.4.	Estrés y activación del eje hipotalámico-hipofisiario adrenal (HHA)	6
2.5.	Hipocampo.....	7
2.6.	Hipotálamo.....	7
2.7.	Hormona liberadora de corticotropina (CRH).....	8
2.8.	La exposición crónica al estrés y la sobre expresión de CRH en mamíferos.....	8
2.9.	El efecto de la incubación en nidos artificiales en crías de tortuga marina.....	10
2.10.	CRH en tortugas	11
3.	Justificación	12
4.	Hipótesis	13
5.	Objetivos	13
6.	Material y métodos	14
6.1.	Animales	14
6.2.	Análisis de datos.....	16
7.	Resultados.....	17
8.	Discusión.....	22
9.	Conclusiones.....	24
10.	Bibliografía.....	26

Resumen

El eje hipotálamo-hipofisario-adrenal desempeña una función central en la expresión y modulación de la respuesta al estrés en vertebrados. Estudios previos han demostrado que la hormona liberadora de corticotropina (CRH), a través de su receptor CRHR1, modula algunos de los efectos deletéreos del estrés sobre el desarrollo de las dendritas, espinas y sinapsis durante etapas tempranas de la vida. Resultados recientes de nuestro grupo han documentado que la incubación artificial de embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* resulta en sobreactivación del eje hipotálamo-hipofisario-interrenal (HHI) y en alteraciones morfológicas en un área cerebral homóloga al hipocampo de mamíferos (corteza dorsomedial). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la incubación artificial en crías de la tortuga *L. olivacea* sobre la presencia de CRH en las regiones del cerebro que la secretan: el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y las cortezas dorsal y dorsomedial. Se evaluaron parámetros morfométricos (masa corporal, longitud corporal y masa interrenal) para documentar la sobreactivación del eje HHA en las crías incubadas en nidos artificiales (NA). Los resultados muestran que las tortugas incubadas en NA tuvieron menor masa ($t=5.5843$, $p<0.001$) y longitud corporal ($t=1.926$, $p<0.05$) que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN). Además, las tortugas incubadas en NA tuvieron glándulas interrenales de mayor masa que las tortugas incubadas en NN ($t=-2.1769$, $p<0.05$). En todas las regiones cerebrales evaluadas, las tortugas incubadas en NA presentaron mayor densidad de células inmunorreactivas a CRH que las tortugas incubadas en NN (corteza dorsal: $t=3.1004$, $p<0.01$; corteza dorsomedial: $t=2.6153$, $p<0.05$; PVH: $t=2.6152$, $p<0.05$). En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que un aumento en la síntesis y secreción de CRH en el PVN y las cortezas dorsal y dorsomedial podría mediar la hipotrofia neuronal reportada en trabajos previos. Estudios posteriores deberán evaluar esta posibilidad.

Palabras claves: eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, *Lepidochelys olivacea*, hipocampo

Abstract

The hypothalamic-pituitary-adrenal axis plays a central role in the expression and modulation of the stress response in vertebrates. Previous studies have shown that corticotropin-releasing hormone (CRH), through its CRHR1 receptor, modulates some of the deleterious effects of stress on dendrite, spine and synapse formation during early stages of life. Recent results from our group have documented that artificial incubation of *Lepidochelys olivacea* sea turtle embryos leads to over-activation of the hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis and morphological alterations in a brain area homologous to the mammalian hippocampus (dorsomedial cortex). In this context, the objective of the present work was to evaluate the effect of artificial incubation in *L. olivacea* turtle hatchlings on CRH presence in the brain areas that secrete it: the hypothalamic paraventricular nucleus (HPV) and the dorsal and dorsomedial cortices. Morphometric parameters (body mass, body length and adrenal mass) were evaluated to document HPA axis over-activation in hatchlings incubated in artificial nests (AN). The results show that turtles incubated in AN had a lower body mass ($t=5.5843$, $p<0.001$) and length ($t=1,926$, $p<0.05$) than turtles incubated in natural nests (NN). Turtles incubated in AN had larger adrenal glands than turtles incubated in NN ($t=-2.1769$, $p<0.05$). In all the brain regions evaluated, turtles incubated in AN had a higher density of CRH immunoreactive cells than turtles incubated in NN (dorsal cortex: $t=3.1004$, $p<0.05$; dorsomedial cortex: $t=2.6153$, $p<0.05$; PVH: $t=2.6152$, $p<0.05$). Overall, the results obtained suggest that increased CRH synthesis and secretion in the PVN and dorsal and dorsomedial cortices could mediate the neuronal hypotrophy reported by previous studies. Further studies should evaluate this possibility.

Key words: hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Lepidochelys olivacea*, hippocampus

1. Introducción

Las tortugas marinas se encuentran clasificadas como especies “en peligro crítico” o “vulnerables” a la extinción, según acuerdos de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (<http://www.iucn.org>) y la norma NOM-059-SEMARNAT-2010. Debido a ello, se han desarrollado múltiples estrategias de conservación. Una de las principales ha sido la creación de viveros o “hatcheries” a donde son reubicados aquellos nidos en riesgo. La arquitectura del nido artificial (NA) es considerablemente diferente de aquélla del nido natural (NN). Tomando en cuenta la operación misma del vivero, el resultado probable es un incremento de la compactación de la arena que reduce la disponibilidad de oxígeno para los embriones (Baldwin *et al.*, 1989; Chacón *et al.*, 2007). Existen una gran cantidad de trabajos que documentan efectos negativos en la incubación de NA sobre el éxito de eclosión (Rees *et al.*, 2002; Özdemir y Türkozan, 2006), la salud (Booth *et al.*, 2004), la proporción de sexos (Moorreale *et al.*, 1982; Mrosovsky, 2008; Pintus *et al.*, 2009), el fenotipo de las crías (Reece *et al.*, 2002), el tiempo de incubación y la pérdida del grado de sincronización en la emergencia (Koch *et al.*, 2006).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha evaluado la respuesta al estrés en crías de tortuga marina *L. olivacea* incubadas en NA. Los resultados muestran que a la emergencia estas tortugas presentan un incremento en los niveles séricos de corticosterona, así como alteraciones en el tamaño y citoarquitectura de estructuras cerebrales y periféricas asociadas al eje hipotálamo-hipofisiario-interrenal (HHI). Entre los cambios más dramáticos se ha descrito hipotrofia de las neuronas piramidales de estructuras homólogas al giro dentado y CA3 del hipocampo en mamíferos (i.e., cortezas dorsal y dorsomedial; Herrera-Vargas *et al. En revisión*).

Reportes previos han demostrado que la hormona liberadora de corticopropina (CRH) y los glucocorticoides (cortisol y corticosterona) modulan la complejidad de los árboles dendríticos y el ensamble de los circuitos neuronales en diversas regiones cerebrales (Chen *et al.*, 2004, 2006; Korosi y Baram 2008). En regiones hipocampales como CA3,

el incremento en los niveles de estas hormonas como consecuencia de la exposición crónica al estrés conduce a la pérdida progresiva de neuronas. Sin embargo, en ratas neonatas no estresadas, el incremento farmacológico de glucocorticoides y CRH tiene efectos diferenciales; mientras el incremento de glucocorticoides no causa alteraciones en las neuronas de la región CA3, la administración de CRH sí causa modificaciones en estas estructuras (Brunson et al., 2001). En concordancia, el bloqueo repetido de los receptores a glucocorticoides (GR), no atenúa los daños causados por el estrés sobre la atrofia dendrítica de las neuronas piramidales de CA3, mientras la administración del receptor 1 de CRH (CRHR1), es capaz de revertir la atrofia neuronal (Liao et al., 2014). En conjunto, estos datos indican que CRH, a través de su receptor CRHR1, desempeña un papel crucial en el desarrollo neuronal en etapas tempranas de la vida, modulando la arborización dendrítica, la espinogénesis y la consecuente formación de sinapsis.

En mamíferos, el hipocampo es una estructura cerebral que participa activamente en la regulación de la respuesta al estrés y en la potenciación a largo plazo (LTP) (Trucco, 2002). En este contexto, en un intento por dilucidar el efecto que la incubación artificial tiene sobre las neuronas piramidales en crías de *L. olivacea*, este trabajo tiene como objetivo evaluar la inmunorreactividad de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH, principal reservorio de la hormona en mamíferos) y en las cortezas dorsal y dorsomedial.

2. Antecedentes

2.1. Tortugas Marinas

Las tortugas marinas en sus primeros años de vida tienden a ser solitarias, en sus etapas juveniles y adultas acostumbran congregarse en sitios de forrajeo, apareamiento y anidación. En la actualidad existen siete especies de tortugas marinas, las cuales se subdividen en dos familias: 1) la familia *dermochelyidae*, en la cual las tortugas no presentan placas en su caparazón (éste está cubierto por una capa gruesa de piel parecida a la del cuerpo). En la actualidad esta familia solo está representada por la tortuga laúd (*Delmochelys coriacea*), la cual es la más grande del mundo ya que llega a medir hasta 2.4 metros de longitud y 500 kg de masa corporal. 2) la familia *Cheloniidae*, la cual presenta un caparazón con escudos o placas evidentes. La familia está conformada por seis especies: tortuga verde (*Chelonia mydas*), toruga carey (*Eretmochelys imbricata*), tortuga cabezona (*Caretta caretta*), tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) y tortuga lora (*Lepidochelys kempii*). Su área de distribución es muy amplia, ya que habitan océanos y mares tropicales y subtropicales, desplazándose en zonas templadas y sub-árticas (Secretaría CIT, 2004).

2.2. Características de la tortuga *Lepidochelys olivacea*.

La tortuga golfina es una de las especies más pequeñas de tortugas marinas, los neonatos presentan tamaños de 3.8 a 5 cm de longitud recta del caparazón y el rango de masa varía desde 12 hasta 22.3 g. En cuanto a los organismos adultos existe mayor variación encontrando individuos de 53 a 79 cm de longitud recta del caparazón y en la longitud curva del caparazón los rangos son de 60.8 a 83.0 cm. En lo que respecta a la masa corporal se encuentran en un rango de 35 a 50 kg. En cuanto a las características fenotípicas la tortuga presenta una cabeza relativamente grande, en forma triangular y con dos pares de escamas frontales, un caparazón cortó y ancho, con cinco a nueve pares de escudos costales. La distribución de la tortuga golfina es circumtropical abarcando el este y oeste del Pacífico, a ambos lados del océano Atlántico y el océano Índico (Varo et al., 2015).

L. olivacea, se reproduce cuando alcanza una talla promedio de 60 cm., principalmente en verano, y la ovoposición tiene lugar de junio a diciembre. Las hembras desovan en un nido con una profundidad de 30 a 55 cm, el número de huevos por ovoposición puede ser de 105 hasta 160 (Parque Nacional Lagunas de Chacahua, 2008). Los huevos ovopositados están recubiertos por un moco claro; esta secreción contiene glicoproteína y albúmina, las cuales tienen propiedades bactericidas y fungicidas (Phillott y Parmenter 2012). El desarrollo embrionario concluye a los 45-51 días después de la puesta, dependiendo de la temperatura, la cual también está involucrada en la determinación del sexo (Parque Nacional Lagunas de Chacahua, 2008).

La tortuga golfina se considera una de las especies más abundantes y la más explotada. Las mayores poblaciones nidificantes se encuentran en Costa Rica, India y México. Sin embargo, algunas de las playas de anidación han sido sobreexplotadas con el saqueo de huevos y el consumo de carne durante décadas, lo que ha conducido al declive a estas poblaciones. Aunque se han implementado medidas de conservación el descenso de la población podría ser irreversible (Varo et al., 2015).

2.3. Amenazas y conservación de las tortugas marinas

Las poblaciones de tortugas marinas en los últimos años han disminuido a nivel mundial, según la Lista Roja de Especies Amenazadas en la IUCN. En esta lista, se especifica que de las siete especies de tortugas marinas que existen cinco se encuentran en peligro de extinción (*Dermochelys coriacea*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys kempii*, *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*) y una en estado vulnerable (*Lepidochelys olivacea*). En la actualidad la tendencia poblacional va en declive (Abella, 2010).

La principal amenaza de las tortugas durante la incubación y la emergencia es la depredación por zorros, zamuros, cuervos, buitres, cangrejos fantasmas (*Ocipode*), gaviotas, garzas, hormigas y algunos depredadores introducidos como son perros, gatos, gallinas y porcinos. En cuanto a los primeros años de vida los principales

depredadores son el atún y el dorado; y en juveniles y adultos los tiburones prácticamente son los únicos predadores naturales (Buitrago, 2003). Sin embargo, la causa principal del declive de las poblaciones se ha dado por el desarrollo humano sobre el medio ambiente en los últimos 50 años. Entre las actividades que han disminuido las poblaciones se encuentran la pesca, y el saqueo indiscriminado de huevos de tortuga, el consumo de carne, el desarrollo costero y los desechos antropogénicos (Abella, 2010).

Debido a ello, se han desarrollado estrategias de conservación que incluyen la creación de viveros a donde son reubicados aquellos nidos en riesgo (Parmenter, 1980). Existen distintos tipos de viveros los cuales pueden ser abiertos, semi-cerrados o cerrados y estos dependen de las condiciones particulares de la playa. Los viveros, deben ser de estructuras temporales, ya que cada temporada deben ser reubicados. Los viveros deben permitir la circulación libre del aire y la caída libre de la lluvia; la altura de las defensas con las que se circula el vivero (malla, malla ciclónica, cedazo y sarán), deben ser de al menos 1.2 m sobre la superficie de la arena y se debe enterrar por lo menos 30 cm en la arena. El vivero debe tener una barrera de protección contra el oleaje y mareas de al menos 50 cm de altura, se debe tener en consideración la temperatura, humedad y vegetación de la arena ya que son factores importantes para el desarrollo de los embriones. El método para acomodar los nidos dentro del vivero es en matriz (columnas y líneas), el espacio entre un nido y otro debe de ser de 1 m² (Chacon *et al.*, 2008).

Sin embargo, se ha documentado que la incubación artificial afecta a los organismos, causando una disminución en el éxito de la eclosión, la proporción de sexos, la vulnerabilidad a infección por bacterias, hongos, insectos entre otros, así como una mayor compactación de la arena la cual reduce la disponibilidad de oxígeno para los neonatos, provocando deformidades (Chacon *et al.*, 2007).

2.4. Estrés y activación del eje hipotalámico-hipofisiario adrenal (HHA)

El estrés es definido como un estado que amenaza la homeostasis del organismo; el cual, es contrarrestado por un conjunto de respuestas fisiológicas, que colectivamente tienen el propósito de re-establecer la homeostasis. Las respuestas al estrés son facilitadas por un conjunto de estructuras del sistema nervioso y órganos blanco (Kyrou y Tsigos, 2008; Weninger et al., 1999). Una de las respuestas al estrés consistente y ampliamente conocida es la activación del eje HHA. De modo general, cuando se está sometido a estrés la respuesta del eje HHA incluye un incremento en la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. La CRH es secretada hacia el sistema portal hipofisario estimulando a la adenohipófisis a secretar la hormona adrenocorticotropica (ACTH). A su vez, la ACTH estimula a la corteza adrenal para secretar glucocorticoides (Figura 1). Sin embargo, estas respuestas deben ser transitorias. Por ello, los glucocorticoides proveen una retroalimentación negativa al eje HHA, mediante la activación de receptores en el PVN, el hipocampo y la amígdala (Brunson *et al.*, 2003).

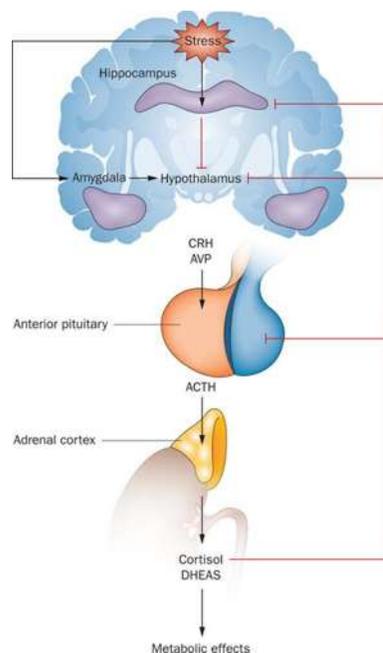


Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal en mamíferos. Tomado de Matteri *et al.*, (2000).

2.5. Hipocampo

La formación hipocampal está constituida por; el giro dentado (Del Carmen, 2009) y el hipocampo propiamente que se subdivide en campos como Cuerno de Amonn (CA) 1, 2 y 3. El hipocampo en su eje longitudinal forma una “C”, la cual se extiende desde el septum al lóbulo temporal del cerebro. La mayoría de las neuronas en la formación hipocampal son glutamatérgicas y comprenden las granulares en el giro dentado y en el hipocampo las piramidales dispuestas en una sola capa de somas (Hargreaves et al., 2005). Las neuronas granulares hacen sinapsis en la capa molecular y en el hilus y CA3. A su vez, la capa molecular se divide en interna, medial y externa. El hipocampo juega un papel central en el funcionamiento neuroendócrino (Del Carmen, 2009) y es uno de los principales blancos de los glucocorticoides, los cuales actúan a través de dos tipos de receptores: tipo I, para mineralocorticoides (MR) y tipo II, para GR. Los glucocorticoides son las principales hormonas circulantes durante la activación de la respuesta al estrés y se ha demostrado que los niveles elevados crónicamente de esta hormona afectan a la plasticidad neuronal y causan pérdida de las neuronas hipocampales (Meraz y Bañuelos, 2009).

2.6. Hipotálamo

El hipotálamo es la región ventral del diencefalo, el cual rodea la cavidad del tercer ventrículo. Las células del hipotálamo son neuroendocrinas y representan la unión entre el sistema nervioso central y el sistema endocrino. El hipotálamo se subdivide en tres regiones: 1) Anterior, la cual incluye las áreas preóptica medial y lateral, hipotalámica anterior y los núcleos PVN, supraóptico, supraquiasmático y parvocelular periventricular; 2) Media, constituida por los núcleos dorsomedial, ventromedial, infundibular o arcuato y las áreas, hipotalámica lateral y dorsal; 3) Posterior, formada por los cuerpos mamilares, los núcleos premamilar, intercalado y el área hipotalámica posterior (González, 1999).

El hipotálamo está constituido por dos tipos de células: las neuronas magnocelulares que se encuentran en el núcleo supraóptico y PVN, y las neuronas parvocelulares que

se encuentran en las áreas mediales, laterales y ventrales. En los núcleos ventromedial, tuberal y arcuato, las neuronas magnocelulares actúan a nivel sistémico (lóbulo posterior- sistema sanguíneo) y las parvocelulares a nivel local (sangre local-lóbulo anterior) (Velayos y Diéguez, 2015).

2.7. Hormona liberadora de corticotropina (CRH)

La CRH es un péptido de 41 aminoácidos que actúa como mediador de la respuesta endocrina, autonómica e inmunológica durante el estrés (Santibañez, 2005). Esta hormona ejerce sus efectos a través de dos tipos de receptores: CRHR1, y CRHR2, los cuales pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G. CRHR1 y CRHR2 difieren en su distribución, así como en su papel en la mediación de las respuestas conductuales y endocrinas (Maras y Baram, 2012).

2.8. La exposición crónica al estrés y la sobre expresión de CRH en mamíferos

Una de las hormonas que se libera durante el estrés es la CRH, la cual se produce principalmente en el PVN y en las interneuronas del hipocampo. Estudios de microscopía electrónica en el hipocampo han demostrado que la CRH se almacena dentro de vesículas en las terminales axonales de las interneuronas, lo que sugiere una producción endógena o local (Maras y Baram, 2012).

La exposición crónica al estrés durante estadios tempranos de vida es capaz de conducir a la activación permanente del eje HHA (Richardson, 2006) al menos en parte debido al incremento en la síntesis y liberación de CRH (Brunson *et al.*, 2001). Bajo condiciones fisiológicas la CRH en el hipocampo inhibe la secreción hipotalámica frenando la activación del HHA. Sin embargo, debido a que en individuos crónicamente estresados las elevadas concentraciones de CRH conducen a alteraciones en la función sináptica y la plasticidad neuronal de la amígdala y el hipocampo, esta última estructura no deprime la función hipotalámica y la activación del eje HHA se mantiene (Brunson *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2012; Olivares *et al.* 2008; Trucco, 2002).

Se ha documentado que ratones adultos sometidos a estrés en las primeras semanas de vida, tienen severas alteraciones en la morfogénesis de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo, lo que sugeriría que los efectos de estrés en las primeras semanas de vida no son transitorios, sino que pueden persistir a lo largo de toda la vida (Liao *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que el bloqueo repetido de los GR, no atenúa los efectos negativos del estrés sobre los niveles de expresión de proteínas sinápticas en las crías estresadas. No obstante, el bloqueo de los CRHR1 es capaz de atenuar los efectos del estrés mediante la regulación de la expresión de proteínas sinápticas en el hipocampo, además de evitar la contracción dendrítica y el déficit cognoscitivo (Ivy *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2014). En conjunto estos resultados sugieren que el sistema CRH-CRHR1 sirve como un modulador crítico de los efectos del estrés durante la vida temprana en el hipocampo.

Otros estudios en ratones han evidenciado que la interrupción selectiva de la vía de señalización CRH/CRHR1 en la circuitería neuronal límbica reduce significativamente el comportamiento relacionado con la ansiedad (Muller *et al.* 2003). Así mismo la aplicación de CRH en cultivos organotípicos del hipocampo en concentraciones nanomolares (parecidas a los niveles fisiológicos durante el estrés) y en un patrón similar a la provocada por eventos estresantes produce la pérdida de espinas dendríticas y dendritas, con efectos severos para la memoria (Maras y Baram, 2012).

Por su parte, durante la exposición a estímulos estresantes recurrentes o sorpresivos se ha observado un aumento en la expresión del mRNA para CRH en la amígdala central (ACE), así como un incremento en la arborización dendrítica o hipertrofia de las neuronas amigdalinas (Mittra *et al.*, 2005). A nivel del PVN del hipotálamo una exposición aguda al estrés genera aumentos en los niveles de expresión de CRH (Brunson *et al.*, 2003; Yi y Barán, 1994). De lo anterior se desprende que la regulación adecuada de la expresión de CRH en la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo conducen a una adecuada regulación del eje HHA ante un estímulo estresante evitando conductas de ansiedad y agresión (Rainnie *et al.*, 2004).

2.9. El efecto de la incubación en nidos artificiales en crías de tortuga marina

Recientemente un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo documentó la sobreactivación del eje HHI en crías de *L. olivacea* incubadas en NA. Esta sobreactivación fue evidenciada por un decremento en la masa y longitud corporales, hipertrofia de las glándulas hipófisis e interrenal, así como un incremento en los niveles circulantes de corticosterona (principal glucocorticoide en reptiles) bajo condiciones basales. Adicionalmente, este trabajo mostró que la incubación artificial también altera el desarrollo de estructuras cerebrales asociadas a la regulación del eje HHA en mamíferos como la corteza dorsomedial (homóloga al hipocampo). Este resultado, en conjunto con el nulo incremento en los niveles circulantes de corticosterona en respuesta a un reto fisiológico agudo (la llegada al mar) presentado por las crías incubadas en NA sugieren que las crías incubadas artificialmente presentan una desregulación del eje HHI (Herrera-Vargas *et al.*, 2017. *En revisión*)

Estos resultados son apoyados por la respuesta al estrés por inmovilización evidenciada en crías de tortugas a los cinco meses de vida. En este estudio las tortugas incubadas en NA presentan un nivel mayor de corticosterona circulante que las crías incubadas en NN (Bucio-Piña, 2016). Adicionalmente, este trabajo reporta que a los cinco meses se mantienen la hipertrofia hipofisiaria e interrenal en las crías incubadas artificialmente.

2.10. CRH en tortugas

En los vertebrados existe una relativa uniformidad la activación del eje HHA o HHI en respuesta a un estresor (Brunson *et al.*, 2003). Sin embargo, en reptiles se tienen pocos datos acerca del efecto del estrés sobre los niveles de expresión y secreción de CRH en respuesta a un estresor. A nuestro conocimiento únicamente han sido determinados los patrones de distribución de CRH bajo condiciones fisiológicas en el cerebro de la especie de tortuga de agua dulce *Mauremys caspica*. Este trabajo muestra una inmunorreactividad para CRH ampliamente distribuida en todo el cerebro, principalmente en el PVN, es decir cortezas dorsal y dorsomedial, la amígdala, la corteza, el núcleo caudado, el núcleo accumbens, el órgano subfornical, el mesencéfalo, el diencéfalo, el infundíbulo, el núcleo pretectal, la sustancia gris periventricular, la formación reticular y el núcleo del rafé. Muchas de las células inmunorreactivas situadas cerca del epéndimo fueron neuronas bipolares. También se pudieron observar fibras inmunorreactivas en la lámina terminal, el haz prosencefálico lateral, el núcleo supra óptico, la eminencia media, la neurohipófisis, el tecto óptico y los núcleos semicircularis y mesencefálico (López *et al.*, 1993).

3. Justificación

En los últimos años las poblaciones de tortugas marinas han disminuido a nivel mundial. Debido a ello se han desarrollado estrategias de conservación, siendo una de las principales la creación de viveros en los cuales son reubicados los nidos en riesgo. Aunque en principio la incubación artificial en viveros se elige como una alternativa adecuada para preservar las poblaciones de tortugas marinas a nivel mundial, estudios previos de nuestro grupo de trabajo han documentado que la incubación artificial conduce a una sobreactivación del eje HHA y a alteraciones en la citoarquitectura de las neuronas de la formación hipocampal en crías de *L. olivacea*. En un intento por entender si las alteraciones neuronales en *L. olivacea* incubadas en nidos artificiales obedecen a incrementos en los niveles de CRH, en este trabajo evaluamos la inmunorreactividad para la proteína CRH mediante inmunohistoquímica en el PVN y en las cortezas dorsal y dorsomedial.

4. Hipótesis

La incubación artificial incrementa la inmunorreactividad de la hormona liberadora de corticotropina en el núcleo paraventricular del hipotálamo y las cortezas dorsal y dorsomedial en crías de *L. olivacea*.

5. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de la incubación artificial sobre la inmunorreactividad de la hormona liberadora de corticotropina en el núcleo paraventricular del hipotálamo y las cortezas dorsal y dorsomedial en crías de *L. olivacea*.

Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto de la incubación artificial sobre parámetros morfo-métricos (masa corporal, longitud corporal y masa interrenal) en crías de *L. olivacea*.
2. Evaluar el efecto de la incubación artificial sobre la inmunorreactividad de la hormona liberadora de corticotropina en el núcleo paraventricular del hipotálamo, la corteza dorsal y la corteza dorsomedial en crías de *L. olivacea*.

6. Material y métodos

6.1. Animales

La colecta de las crías de *L. olivacea* se realizó en la playa de Boca Seca, Municipio Lázaro Cárdenas, Michoacán (Permiso SEMARNAT: CF05459-14-07-13). La colecta se llevó a cabo en el mes de octubre del 2015. Para los análisis de inmunorreactividad a CRH en total se colectaron 18 crías de tortugas a la emergencia provenientes de tres NN (n=9; 3 tortugas por nido) y de tres NA (n=9, tres organismos por nido). Para los análisis de parámetros morfométricos (masa corporal, longitud cabeza cola y masa adrenal) se consideraron en total 54 organismos; los 18 animales antes mencionados y 36 animales provenientes de la misma colecta pero utilizados para otro proyecto de investigación.

Análisis morfo-métricos

Las crías fueron colectadas a la emergencia del nido con un intervalo de 5 minutos entre cada una para garantizar la adecuada representación de todo el nido en el análisis. Una vez colectadas, las crías fueron pesadas, medidas y sacrificadas rápidamente por decapitación. El peto fue retirado y las carcasas fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% amortiguado en buffer de fosfatos (PBS) 0.1M. En el laboratorio, las glándulas interrenales fueron disecadas bajo microscopio estereoscópico y su masa húmeda fue obtenida en balanza analítica.

Análisis inmunohistoquímicos

El cerebro de las crías fue disecado inmediatamente después del sacrificio y fijado por inmersión en paraformaldehído al 4% durante tres días a 4°C. Una vez en el laboratorio, los cerebros fueron crioprotegidos con sacarosa amortiguada al 30% hasta que decantaron. Entonces los cerebros fueron postfijados en solución de Bouin (Solución saturada de ácido pícrico) por 48 horas a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se incubaron de nuevo en sacarosa al 30% para después ser congelados en medio de inclusión Tissue-Tek (4583) y seccionados coronalmente a 60 µm en criostato (Hydrax C25 MICROM). Los cortes fueron colectados serialmente en cajas de 12 pozos en solución crioprotectora (50% PBS, 25% glicerol y 25% etilenglicol) y almacenados a -20°C hasta su posterior uso.

Antes de comenzar la inmunohistoquímica, los cortes de uno de cada tres pozos fueron teñidos con el colorante violeta de cresilo (el cual tiñe la sustancia de Nissl asociada a las neuronas) con el objetivo de localizar las regiones de interés. Para realizar esta técnica, los cortes fueron lavados con PBS y montados en portaobjetos gelatinizados, enjuagados con agua e incubados con violeta de cresilo (0.1%). Posteriormente los tejidos, se pasaron a series de etanol para deshidratarlos y se montaron con resina sintética y cubreobjetos. Una vez identificados por microscopía de campo claro los cortes que incluyeran las regiones de interés, se utilizaron para la inmunohistoquímica de CRH en cortes provenientes de otros pozos.

Para este procedimiento el protocolo que se utilizó fue: tres lavados de etanol al 70% para retirar restos de Bouin, peróxido al 3% en PBS durante 10 minutos, tres lavados de TBS, incubación en desenmascarador de antígenos (20X inmuno/DNA retriever with citrate) 1:20 una hora a 60 °C y 15 minutos a temperatura ambiente, seguida de tres lavados con TBS, suero de caballo al 10% diluido en TBS-Triton X-100 (0.25%, TBS-T) durante una hora, e incubación en anticuerpo primario CRH1 (ab59023, goat anti-CRH1, lote:GR25598-19, abcam) diluido en TBS-T durante 16 hrs, dos lavados con TBS durante cinco minutos, incubación en anticuerpo secundario 1:500 (Dky X Goat igG Biotin, lote: 2677872 AP1808 Millipore) diluido en TBS-T durante dos horas, incubación en complejo avidina (0.25%)/biotina (0.25%) diluido en TBS-T durante una hora, y revelado con el kit diaminobencidina (SK-4100) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se detuvo la reacción con TBS y los cortes se montaron en portaobjetos, se deshidrataron y se cubrieron con resina sintética y cubreobjetos.

Las secciones inmunoteñidas fueron fotografiadas bajo el microscopio óptico de campo claro (Leica DM3000) a una magnitud de 1000X. En el caso de la corteza dorsal se utilizaron ocho cortes a lo largo del eje anteroposterior y se tomaron cuatro fotografías por corte. Para la corteza dorsomedial se utilizaron seis cortes y se tomaron tres fotografías por corte. Finalmente, para el PVN se utilizaron cinco cortes y cuatro fotografías por corte abarcando toda la estructura. En cada una de las estructuras se utilizaron ambos hemisferios (Figura 2).

Una vez realizadas las fotografías, las células inmunopositivas a CRH fueron cuantificadas por mm^2 con la ayuda del plug-in Cell Counter del programa ImageJ (National Institute of Health, <https://imagej.softonic.com>). Los criterios que se utilizaron para la cuantificación de las células fueron: área y circularidad. Se cuantificaron las fotografías de cada corte por estructura cerebral y se obtuvo una sumatoria total por tortuga.

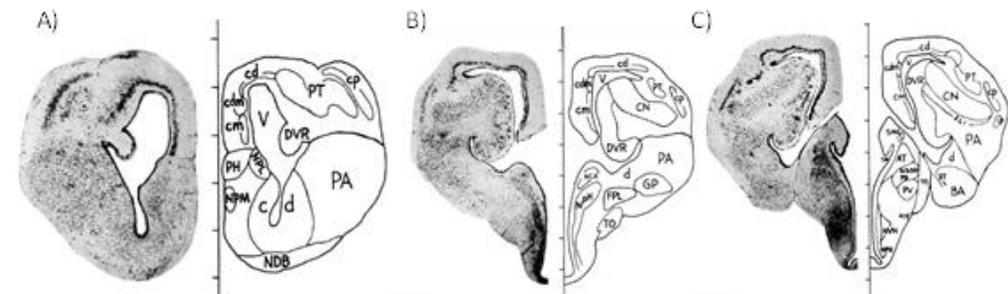


Figura 2. Microfotografías representativas de tres cortes coronales de tortuga (*Chrysemys picta picta*) a lo largo del eje anteroPosterior donde se muestran las regiones de interés. En cada caso, el corte izquierdo es una hemisección teñida con violeta de cresilo, y el esquema del lado derecho muestra las regiones cerebrales localizadas en cada corte. cd, corteza dorsal; cdm, corteza dorsomedial; PVH, núcleo paraventricular (Tomado de Powers y Reiner, 1980).

Con el objetivo de evaluar la intensidad de la inmunorreactividad para CRH, las mismas fotografías utilizadas para cuantificar el número de células fueron utilizadas para realizar una densitometría. Para ello, el threshold de las imágenes fue ajustado con el programa ImageJ y cuantificada la intensidad promedio por fotografía. Los resultados de cada imagen fueron promediados por estructura por tortuga.

6.2. Análisis de datos.

Los resultados de los grupos evaluados (NN vs. NA) fueron comparados mediante una prueba t de Student, previa verificación de la normalidad de las varianzas, con el paquete estadístico R 3.2.5. El criterio para considerar significancia fue de $p \leq 0.05$.

7. Resultados

Análisis morfo-métricos

Con el objetivo de evaluar el efecto de incubación artificial sobre los parámetros morfométricos se analizaron la masa y la longitud corporal. Los resultados muestran que el grupo de tortugas incubadas en NA presenta menor masa ($t= 5.5843$, $p<0.001$) y longitud corporal ($t = 1.926$, $p<0.05$) que el grupo de tortugas incubadas en NN (Figura 3).

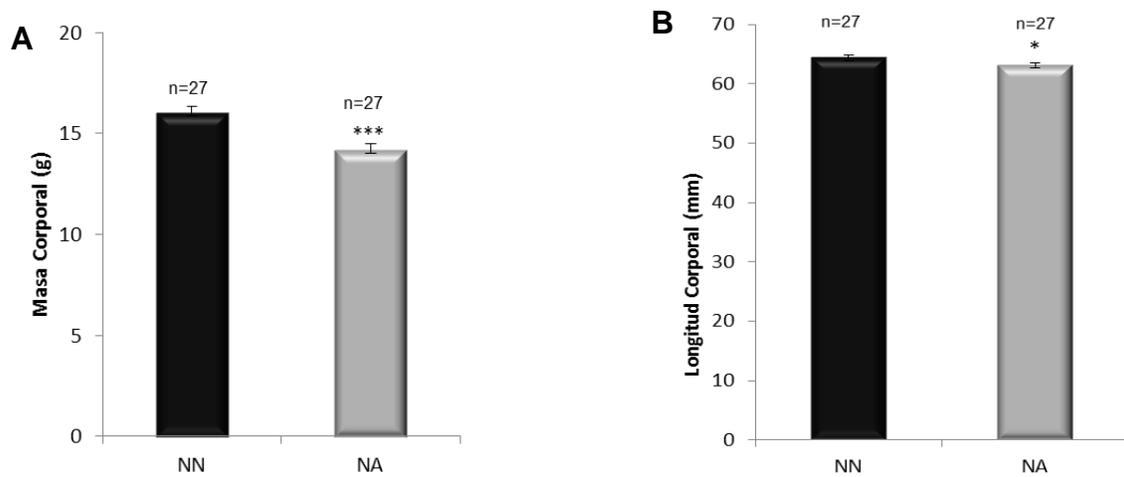


Figura 3. Las tortugas incubadas en nidos artificiales (NA) presentan menor masa y longitud corporal a la emergencia que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN). La gráfica A muestra la masa corporal (g), y la gráfica B la longitud corporal (mm) de tortugas incubadas en NN y NA. El número de tortugas analizadas por grupo se presenta encima de cada barra. (PROM ± EST. *** $p<0.001$, * $p<0.05$).

Debido a que en este trabajo no se cuantificaron los niveles de corticosterona, se pesaron las glándulas interrenales con el objetivo de evidenciar (de manera indirecta), la activación del eje HHA. Los resultados muestran que las tortugas incubadas en NA presentan glándulas de mayor masa que las tortugas incubadas en NN ($t = -2.1769$, $p < 0.05$).

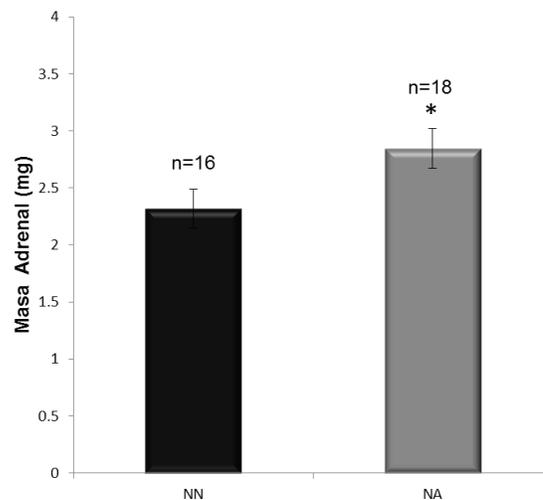


Figura 4. Las tortugas incubadas en nidos artificiales (NA) presentan mayor masa interrenal a la emergencia que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN). La gráfica muestra la masa interrenal (mg) de tortugas incubadas en NN y NA. El número de tortugas analizadas por grupo se presenta encima de cada barra. (PROM \pm EST. * $p < 0.05$).

Análisis de inmunohistoquímica

Una vez que se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica para CRH (Apéndice 1), se procedió al análisis de las estructuras de interés (*i. e.*, PVH, corteza dorsal y dorsomedial). En todas las regiones cerebrales evaluadas las tortugas incubadas en NA presentaron mayor número de células inmunorreactivas a CRH que las tortugas incubadas en NN por mm^2 (PVH: $t = 2.3498$, $p < 0.05$. Figura 5; corteza dorsal: $t = 3.1004$, $p < 0.01$. Figura 6; corteza dorsomedial: $t = 2.6153$, $p < 0.05$. Figura 7).

Adicionalmente, el análisis de densitometría fue realizado en las mismas fotografías donde se cuantificó el número de células inmunorreactivas para CRH. Este análisis muestra que si bien en todas las estructuras valoradas la intensidad promedio fue mayor para las tortugas incubadas artificialmente, en ningún caso se alcanzó la significancia estadística (resultados no mostrados).

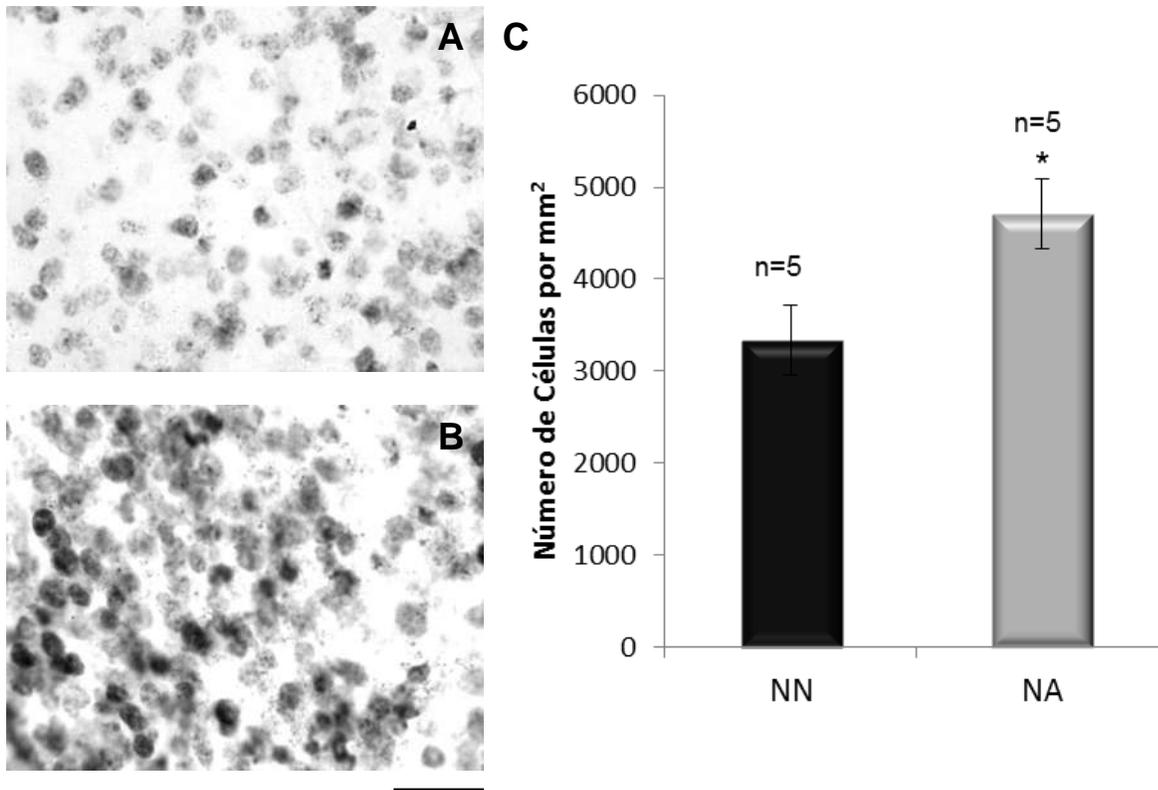


Figura 5. Las tortugas incubadas en nidos artificiales (NA) presentan mayor número de células inmunorreactivas a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN) en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN). A y B son microfotografías representativas de células inmunorreactivas a CRH en el PVN de tortugas incubadas en NN y NA, respectivamente. Barra de escala = 20 micrómetros. C, la gráfica muestra el número de neuronas positivas a CRH en las tortugas incubadas en NN y NA. El número de tortugas analizadas provenientes de tres nidos por grupo se presenta encima de cada barra. (PROM ± EST. * $p < 0.05$).

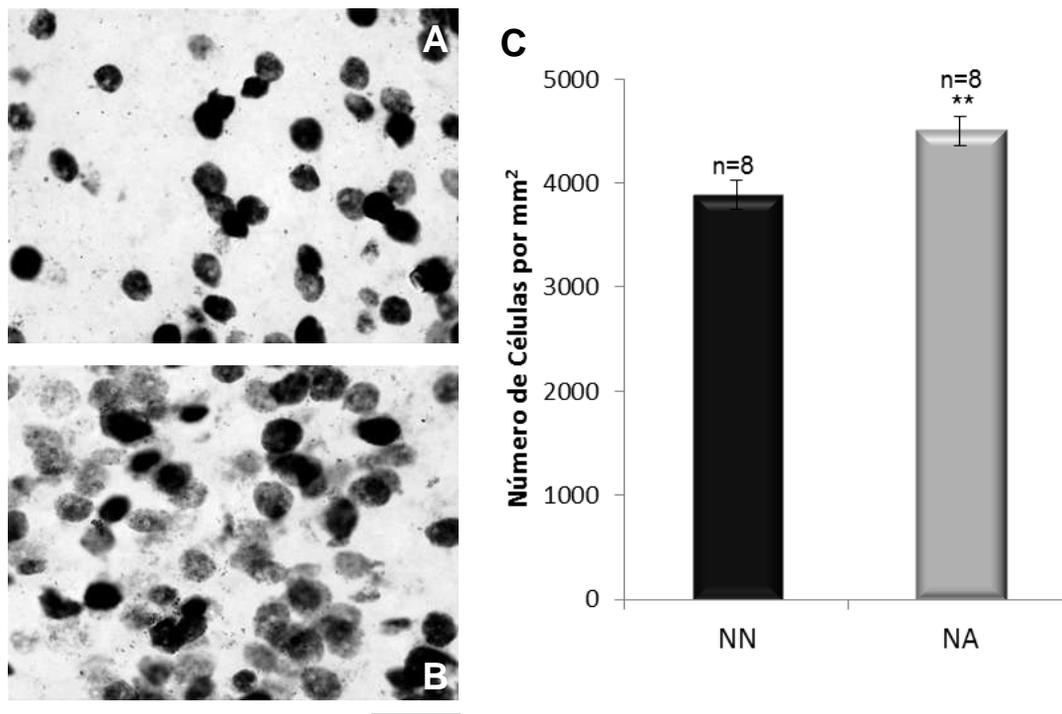


Figura 6. Las tortugas incubadas en nidos artificiales (NA) presentan mayor número de células inmunorreactivas a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN) en la corteza dorsal. A y B son microfotografías representativas de células inmunorreactivas a CRH en la corteza dorsomedial de tortugas incubadas en NN y NA, respectivamente. Barra de escala = 20 micrómetros. C, la gráfica muestra el número de neuronas positivas a CRH en las tortugas incubadas en NN y NA. El número de tortugas analizadas por grupo se presenta encima de cada barra. (PROM ± EST. **p<0.01).

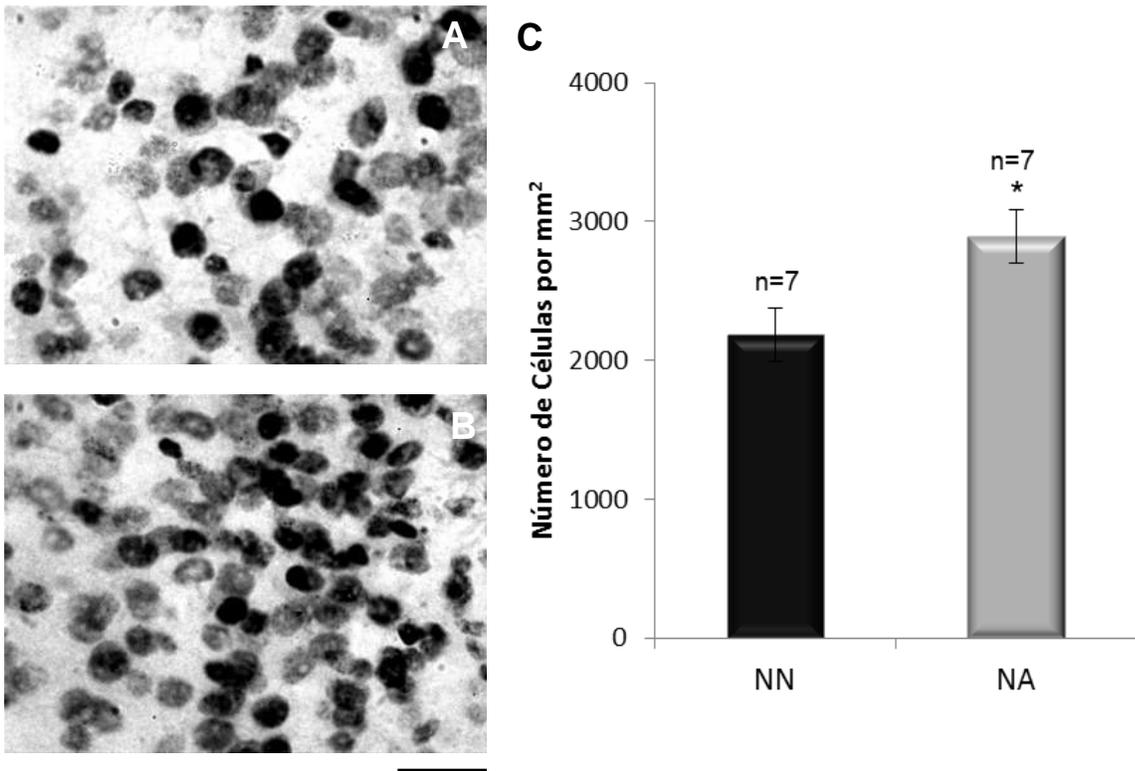


Figura 7. Las tortugas incubadas en nidos artificiales (NA) presentan mayor número de células inmunorreactivas a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN) en la corteza dorsomedial. A y B son microfotografías representativas que muestran células inmunorreactivas a CRH en la corteza dorsal de tortugas incubadas en NN y NA, respectivamente. Barra de escala = 20 micrómetros. C, la gráfica muestra el número de neuronas positivas a CRH en las tortugas incubadas en NN y NA. El número de tortugas analizadas por grupo se presenta encima de cada barra. (PROM ± EST. * $p < 0.05$).

8. Discusión

Con el objetivo de proteger a los embriones de tortugas marinas de la depredación, saqueo y condiciones ambientales desfavorables durante la incubación, se ha desarrollado como estrategia de conservación la creación de viveros en los cuales son reubicados los nidos en riesgo. Aunque en principio la incubación artificial en viveros se elige como una alternativa adecuada para preservar las poblaciones de tortugas marinas a nivel mundial, estudios previos de nuestro grupo de trabajo han documentado que la incubación artificial conduce a una sobreactivación del eje HHA y a alteraciones en la citoarquitectura de las neuronas de la formación hipocampal en crías de *L. olivacea*. Con el interés de explicar el mecanismo que subyace esta hipotrofia neuronal en *L. olivacea*, en este trabajo evaluamos el efecto de la incubación artificial sobre la inmunoreactividad para la proteína CRH en el PVN y en las cortezas dorsal y dorsomedial. Nuestros resultados muestran una densidad mayor de células (muy probablemente neuronas) inmunopositivas para CRH en todas las estructuras cerebrales evaluadas en crías incubadas en NA en comparación con aquellas incubadas en NN.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las tortugas incubadas en NA presentaron menor masa y longitud corporal a la emergencia que las tortugas incubadas en NN, así como una mayor masa adrenal. Ha sido documentado en diversas especies de vertebrados que la exposición crónica a estresores durante etapas tempranas de la vida conduce a baja talla corporal al nacimiento (Harris y Seckl, 2011). Así mismo, ha sido ampliamente reportado que la sobreactivación del eje HHA en mamíferos conduce a un incremento en la masa adrenal. Adicionalmente, una de las respuestas fisiológicas más usadas para valorar la respuesta a un estresor es la medición de los niveles de glucocorticoides. Trabajos previos en nuestro laboratorio han evidenciado una correlación entre masa interrenal y los niveles de glucocorticoides en crías de tortugas incubadas en NN y NA (Herrera-Vargas *et al.*, 2017. *En revisión*). En

conjunto, los resultados sugieren que las tortugas *L. olivacea* muestreadas en el presente estudio estuvieron sometidas a estrés crónico durante la incubación en NA.

En el presente trabajo evaluamos el efecto de la incubación NA sobre la inmunorreactividad de CRH en estructuras cerebrales asociadas a la regulación del eje HHA en mamíferos. En primer lugar, nuestros resultados muestran que la síntesis (y muy probablemente la liberación) de CRH en el PVN, es mayor en crías de tortugas incubadas artificialmente. Se ha reportado que en el PVN existen receptores para CRH que censan el incremento en la hormona y regulan a la baja su síntesis a nivel de mensajero cesando la respuesta del eje HHA (Korosi et al., 2010). Sin embargo, en individuos crónicamente estresados los altos niveles de CRH no deprimen la función hipotalámica y la activación del eje HHA se mantiene (Olivares *et al.* 2008).

Por lo que respecta a la formación hipocampal (cortezas dorsal y dorsomedial), nuestros resultados muestran que las tortugas incubadas en NA presentan una mayor densidad de neuronas inmunorreactivas para CRH. Diversos trabajos han reportado que la sobreexpresión postnatal de CRH en el prosencéfalo de ratones causa déficit cognoscitivo, una atenuada LTP y reducción de las espinas dendríticas en el área CA3 del hipocampo. Por su parte, la aplicación de antagonistas para CRHR1 restaura la función cognitiva, la LTP y la densidad de espinas neuronal en el área CA3 (Wang *et al.*, 2011; Weninger et al., 1999) . En conjunto, estos resultados sugirieren que en el cerebro anterior la vía CRH/CRHR1 es crucial para la programación de la función cognoscitiva causada por el estrés en las primeras etapas de vida. Así, incrementados de CRH en las cortezas dorsal y dorsomedial de tortugas incubadas artificialmente sugiere alteraciones en la regulación de la síntesis y liberación de esta hormona también a nivel hipocampal, esto sugiere que las alteraciones en la morfología neuronal reportadas previamente por nuestro grupo de trabajo (Herrera-Vargas *et al.*, 2017. *En revisión*) pueden ser explicadas al menos parcialmente por esta vía.

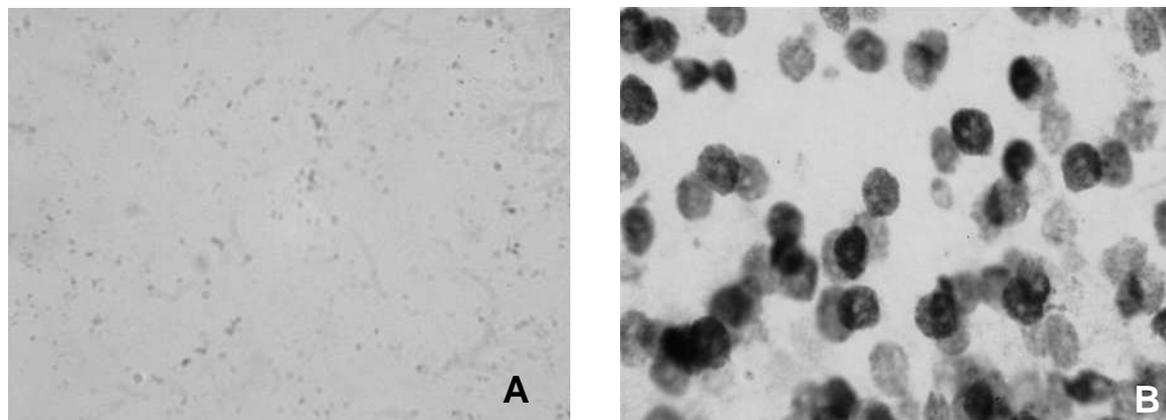
Brunson et al., (2001) reportan que durante el estrés se elevan los niveles de glucocorticoides plasmáticos, los cuales promueven la expresión de CRH en el núcleo central de la amígdala (ACe), al mismo tiempo esta elevación de los glucocorticoides causa una retroalimentación negativa a nivel del hipocampo causando una supresión de mRNA de CRH en el PVN de ratas neonatas. Esta regulación diferencial de la expresión de CRH en el PVN mediada por glucocorticoides, causa una regulación adecuada del eje HHA. Sin embargo, durante el estrés crónico se han reportado cambios significativos en la sobre-expresión de CRH en PVN. Herrera-Vargas *et al.*, (2017. *En revisión*) reportan que las tortugas a la emergencia de NA presentan una elevación de glucocorticoides y alteraciones en la citoarquitectura de las neuronas del hipocampo aunado a los resultados obtenidos en el presente trabajo se podría suponer una desregulación del eje HHA. Así, para mejorar su supervivencia, un organismo necesita recordar y aprender de eventos amenazantes o estresantes. Para que esto suceda se requiere de mecanismos fisiológicos que se activan durante el estrés. En los resultados obtenidos se observa una posiblemente alteración en la síntesis de CRH que podría causar un déficit de la memoria y el aprendizaje así como una atenuada LTP. Lo que conduciría a afectaciones en un futuro para las tortugas al intentar aprender sus rutas de migración para regresar a sus playas de anidación.

9. Conclusiones

Las células CRH muestran una respuesta diferencial, medida mediante la inmunorreactividad para CRH, en crías recién eclosionadas de NA. Los resultados obtenidos, en conjunto con los reportados en nuestro laboratorio apuntan a que la incubación artificial causa una desregulación del eje HHA, en crías de tortuga *L. olivacea* a la emergencia de NA.

Anexo

Con la finalidad de analizar la inmunorreactividad de CRH en crías de *L. olivacea*, primero se analizó la eficiencia del anticuerpo para unirse al antígeno de interés en el tejido de las crías, los resultados obtenidos demuestran el anticuerpo reconoce al antígeno de manera específica (Apéndice 1).



±Apéndice 1. El anticuerpo anti-hormona liberadora de corticotropina (CRH) reconoce eficientemente al antígeno en el cerebro de tortuga marina *L. olivacea*. A y B son micrografías representativas de un tejido control de inmunohistoquímica (sin anticuerpo primario) y un tejido experimental (incubado con anticuerpo anti-CRH). Barra de escala = 20 micrómetros.

10. Bibliografía

- Abella P. E., 2010. Factores Ambientales y de Manejo que Afectan al Desarrollo Embrionario de la Tortuga Marina *Caretta caretta*. Implicaciones en Programas de Incubación Controlada. Testis Doctoral.
- Andres A. L., Regev L., Phi L., Seese R. R., Chen Y., Gall C. M., and Baram T. Z. 2013. NMDA Receptor Activation and Calpain Contribute to Disruption of Dendritic Spines by the Stress Neuropeptide CRH. *The Journal of Neuroscience*, 33(43):16945–16960 • 16945.
- Baldwin J. E., Mortimer G. K., and Patak A. 1989. Anaerobic metabolism during dispersal of green and loggerhead turtle hatchlings. *Comp Bio and Phys, Part A, Physiology*. 94, 663-665.
- Booth D. T., Burgess E., McCosker J. and Lanyon J. M. 2004. The influence of incubation temperature on post-hatching fitness characteristics of turtles. *Int Congr Ser*. 1275: 266–233.
- Brunson K. L., Avishai-Eliner S., Hatalski C. G. and Baram T. Z., 2001. Neurobiology of the stress response early in life: evolution of a concept and the role of corticotropin releasing hormone. *Mol Psychiatry*. 6 (6), 647– 656. doi:10.1038/sj.mp.4000942.
- Brunson K. L., Chen Y., Avishai-Eliner S. and Baram T. Z.. 2003. Stress and the Developing Hippocampus, Department of Anatomy and Neurobiology and Department of Pediatrics, University of CA at Irvine, Irvine, CA 92697 USA; Hebrew University and Kaplan Hospital, Rehovoth, Israel.
- Brunson K. L., Eghbal-Ahmadi M., Bender R., Chen Y., and Baram T. Z. 2001. Long-term, progressive hippocampal cell loss and dysfunction induced by early-life administration of corticotropin-releasing hormone reproduce the effects of early-life stress. Departments of Anatomy Neurobiology and Pediatrics, University of California, Irvine, CA 92697-4475
- Buitrago J., 2003. Amenazas Naturales y Antrópicas en Tortugas marinas. http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/T01Amenazas_naturales.PDF
- Chacón D, Sánchez J, Calvo J and Ash J. 2007. Manual para el manejo y la conservación de las tortugas marinas en Costa Rica; con énfasis en la operación de proyectos en playa y viveros. Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE). Gobierno de Costa Rica. San José. 103 pp.
- Chacon D., Dick B., Harrison E., Sarti L. y Solano M., 2008. Manual sobre técnicas de manejo y conservación de las tortugas marinas en playas de anidación de Centroamérica.
- Chen Y, Bender R A, Brunson K L, Pomper J K, Grigoriadis D E, Wurst W, and Baram T Z. 2004. Modulation of dendritic differentiation by corticotropin-releasing factor in the developing hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 15782–15787. [PubMed: 15496472].
- Chen Y, Patel N A, Dube C, Burgdorff C J, and Baram T Z. 2006. Dendritic branching and spine density in developing hippocampus are governed by corticotropin-releasing

hormone receptors: implications for early-life stress. *Abstarct Soc. for Neuroscience*. 357, 8- 29.

Chen Y., Andres A. L., Frotscher M. and Baram T. Z. 2012. Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Volume 6 , Article 13.

Del Carmen P. V., 2009. Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto. Tesis de doctorado en la universidad de Buenos Aires.

González G. F., 1999. Neuroendocrinología. *Revista Peruana de Endocrinología y Metabolismo*; 4 (2):57-82.

Hargreaves E.L., Rao G., Lee I., and Knierim J.J. (2005). Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science* 308, 1792-1794.

Herrera V. M. A., Meléndez H. E., Gutiérrez O. G. y Fuentes F. A. L. 2014. Efectos de la exposición prenatal al estrés asociado a la incubación artificial, sobre el desarrollo de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*). *Biológicas*, 16(1): 53 – 58

Ivy A. S., Rex C. S., Chen Y., Dube´ C., Maras P. M., Grigoriadis D. E., Gall C. M., Lynch G. and Baram T. Z., 2010. Hippocampal Dysfunction and Cognitive Impairments Provoked by Chronic Early-Life Stress Involve Excessive Activation of CRH Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 30(39):13005–13015.

Koch V., Nichols W. J., Peckham S. H. and De la Toba V. 2006. Estimates of sea turtle mortality from poaching and by catch in Bahia Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Biol Conserv*. 128, 327–334

Korosi A. and Baram T. Z. 2008. The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *Eur J Pharmacol*. 583 (2-3), 204–214.

Kyros and Tsigos. 2008. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones*. 7 (4), 287–290.

Liao X-M., Yang X-D., Jia J., Li J-T., Xie X-M., Su Y-A., Schmidt M. V., Si T-M. and Wang X-D., 2014. Blockade of Corticotropin-Releasing Hormone Receptor 1 Attenuates Early-Life Stress-Induced Synaptic Abnormalities in the Neonatal Hippocampus. *Wiley periodicals, INC*. 24:528–540.

Lopez A.M.D., Mancera J.M., P~rez-Figares J.M., and Fernfindez-Llebrez P., 1993. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor in the brain of the turtle, *Mauremys caspica*. *Anat Embryol*, 188:163-171.

Maras P. M. and Baram T. Z., 2012. Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. Departments of Anatomy/Neurobiology, Pediatrics and Neurology, University of California Irvine, Irvine, CA 92697, USA.

Matteri R.L., Carroll J.A. y Dyer C.J., 2000. Neuroendocrine responses to stress. In *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare* (p. 76). Retrieved from <http://books.google.com/books>

-
- Meraz M. Tzintli and Bañuelos P. J., 2009. Efecto del Estrés Crónico Sobre la Remodelación Dendrítica en la Región CA3 del Hipocampo... Tzintli Meraz M et. al. ISSN: 1665-5745 <http://www.e-gnosis.udg.mx/vol7/art3> Efecto del Estrés crónico sobre la remodelación dendrítica en la región CA3 del hipocampo Effect of chronic stress on the dendritic remodeling in the region CA3 hippocampal. Vol. 7, Art. 3
- Mitra R, Jadhav S, McEwen B S, Vyas A, and Chattarji S. 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (26), 9371–9376.
- Moorreale S J, G J Ruiz, J R Spotila and E A Standora. 1982. Temperature dependent sex determination: current practices, threaten conservation of sea turtles. *Science*. 216, 1245-1247.
- Mrosovsky N., 2008. Against Oversimplifying the Issues on Relocating Turtle Eggs. *Environmental Management*. 41, 465–467.
- Muller B. M., Zimmermann S., Sillaber I., Hagemeyer P. T., Deussing M. J., Timpl P., Kormann S. D. M., Droste K. S., Kuhn R., Reul M. H. M. J., Holsboer F. and Wurst W., 2003. Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nature neuroscience*.
- Olivares P-M R., Toledo G. C., Vera M. Y., Hernán P. T. y Aboitiz D. F., 2008. Efectos del estrés sobre el sistema nervioso central. *Av. Cs. Vet- Vol. 23, N° 1 y N° 2*,
- Özdemir B. A. and Türkozan O., 2006. Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in Northern Cyprus. *Turkish Journal of Zoology*. 30 (2), 141-146.
- Parmenter C J., 1980. Incubation of the eggs of the green sea turtle, *Chelonia mydas*, in Torres Strait, Australia: the effect of movement on hatchability. *Aust. Wildl Res*. 7, 487-91.
- Parque Nacional Lagunas de Chacahua., 2008. Programa de Monitoreo de la Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Disponible en internet desde: <http://www.conanp.gob.mx/acciones/fichas/chacahua/info/info.pdf> [Consulta: 16 de febrero de 2011].
- Phillott A. D. and Parmenter C. J., 2012. Anti-fungal Properties of Sea Turtle Cloacal Mucus and Egg Albumen. *Marine Turtle Newsletter* 134:17-21.
- Pintus K. J., Godley B. J., MCGowan A. and Broderick N. C., 2009. Impact of Clutch Relocation on Green Turtle Offspring. *The Journal of Wildlife Management*. 73 (17), 1151–1157.
- Rainnie D. G., Bergeron R., Sajdyk T. J., Patil M., Gehlert D.R., Shekhar A., 2004. Corticotrophin Releasing Factor-Induced Synaptic Plasticity in the Amygdala Translates Stress into Emotional Disorders. *The Journal of Neuroscience*, April 7, 24(14):3471–3479 • 3471.

-
- Reece S.E., Broderick A.C., Godley B.J. and West S.A., 2002. The effects of incubation environment, sex and pedigree on the hatchling phenotype in a natural population of loggerhead turtles. *Evolutionary Ecology Research*, 4: 737–748.
- Trucco, 2002. Stress and mental disorders: neurobiological and psychosocial aspects. *Rev. chil. neuro-psiquiatr.* 40 (2), 8-19. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272002000600002>
- Varo C. N., Monzón A. C., Carrillo M., Calabuig P. y Loza A. L., 2015. Tortuga olivácea – *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829).
- Velayos J.L. y Diéguez G., 2015. Anatomía y fisiología del sistema nervioso central. CEU Ediciones. ISBN: 978-84-15949-89-3
- Wang X-D., Rammes G., Kraev I., Wolf M., Liebl C., Scharf S. H., Rice C.J., Wurst Wolfgang, Holsboer Florian, Deussing Jan M., Baram Tallie Z., Stewart Michael G., Müller M. B., and Schmidt M.V., 2011. Forebrain CRF1 Modulates Early-Life Stress-Programmed Cognitive Deficits. *The Journal of Neuroscience*, 31(38):13625–13634 • 13625
- Weninger S.C., Dunn A.J., Muglia L.J., Dikkes P., Miczek K. A., Swiergiel A. H., Berridge C. W., and Majzoub J. A., 1999. Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. *Psychology Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 8283–8288.
- Yi S.J., Baram T.Z., 1994. Corticotropin-releasing hormone mediates the response to cold stress in the neonatal rat without compensatory enhancement of the peptide's gene expression. *Endocrinology*.135, 2364–2368. [PubMed: 7988418].
- Harris A., Seckl J., 2011. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and Behavior* 59 279–289.