



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LOS RECURSOS NATURALES

PROGRAMA DE MAESTRIA EN ECOLOGIA INTEGRATIVA

EFFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO EMBRIONARIO ASOCIADO A LA
INCUBACION EN NIDOS HECHOS POR EL HOMBRE SOBRE ASPECTOS
CELULARES DE LAS GÓNADAS EN LA TORTUGA MARINA (*Lepidochelys
olivacea*).

PROYECTO DE TESIS DE MAESTRIA QUE PRESENTA:

BIOL. ALEJANDRA CASTELLÓN RUÍZ

Para obtener el título de Maestra en Ciencias en Ecología Integrativa

TUTOR: Dra. ALMA LILIA FUENTES FARÍAS

Morelia Michoacán Agosto 2018

El presente trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Alma Lilia Fuentes Farías directora del Instituto de los recursos Naturales (INIRENA) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH); Así como con el apoyo académico de la Dra. Esperanza Meléndez Herrera, del Laboratorio de Ecofisiología Animal del INIRENA de la misma universidad.

La realización de este trabajo fue gracias al financiamiento 598723 CVU 738365 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Para llevar a cabo la colecta de crías de *Lepidochelys olivacea* la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) otorgó el permiso con oficio y número de licencia SGPA / DGVS / 05459/13, SGPA/DGVS/10395/17.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por ser pieza fundamental en mi formación académica, ya que ha fomentado los valores que rigen mi vida profesional y que hacen de mí un ciudadano comprometido con su país. De igual forma, agradezco de manera muy especial a mi tutora, la Dra. Alma Lilia Fuentes Farías por sus enseñanzas, disposición y apoyo para la realización del presente trabajo, de igual manera agradezco a los integrantes del Comité revisor por el beneficio de sus comentarios y sugerencias, entre los cuales se encuentran: la Dra. Esperanza Meléndez Herrera, el Dr. Omar Chassin Noria, la Dra. Clementina González y la Dra. María de la Luz Torner Aguilar.

Así como también, las recomendaciones de la M. en C. Antonia Herrera Vargas y la M. en C. Nancy Díaz, la Bióloga Fanny Edit Bucio Piña y el Biólogo Edel Pineda López apoyo en campo, así como, el QFB Miguel Avalos Viveros por su apoyo técnico en el laboratorio de Ecofisiología animal en el INIRENA.

De manera especial agradezco las enseñanzas, el apoyo y disposición del el M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia del Instituto Biomédicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM), quien fue una pieza fundamental en mi formación como M. en C., al enseñarme el procesamiento de muestras histológicas de los conductos urogenitales de las crías de tortuga *L. olivacea*, así como, a la C. en I. Sibila Concha Santos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la UMSNH, por el apoyo técnico al facilitarme el equipo necesario para la medición del peso de las muestras procesadas en la realización de este proyecto.

A mis profesores y compañeros de la Maestría en Ciencias en Ecología Integrativa (MCI), quienes con su grata compañía, sus ánimos y paciencia generado a partir del trato continuo, nos llevó a compartir agradables experiencias a lo largo de mi trayectoria y formación en la maestría, lo que hizo que se aligeraran los días de arduo trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres Ma. Esther Ruiz Santoyo y José Luis Castellón Villafuerte

Por darme un buen ejemplo, su apoyo, comprensión, paciencia y la fortaleza para cumplir la meta ya que fueron los pilares más importantes para construir lo que ahora soy.

A mi hermana Citlalli Yolanda Castellón Ruiz.....Por ser mi mejor ejemplo de no rendirme a pesar de todo, por su confianza en mí, por todo su apoyo y sus enseñanzas a lo largo de toda mi vida.

A mis sobrinos José Carlos Argueta Castellón y Victoria Valentina Argueta Castellón.....Por su alegría y sus abrazos en esos días difíciles, que hacían que el día tuviera otro sentido.

A mi cuñado Carlos Argueta Flores.....Por escucharme, aconsejarme y ayudar a soltar cosas que no necesitaba en este viaje llamado maestría.

A mi compañero y amigo Miguel Avalos Viveros.....Por su compañía en esos días de arduo trabajo en el laboratorio, cuando éramos los primeros en llegar y los últimos en irnos.

A mi compañero y amigo Edel Pineda López.....Por su compañía en esos recorridos que se realizaban a lo largo de la playa para monitorear cada uno de los nidos en las noches oscuras de campo.

A aquellas personas que fueron parte muy importante de esta gran aventura y por diferentes cuestiones ahora ya no están conmigo y que sin embargo, dejaron una huella imborrable en mi pensamiento y en mi corazón.

Gracias a todos y cada uno de ellos por sus comentarios alentadores que hacían cada vez más fuertes mis alas para emprender el vuelo en el largo camino de la Ciencia.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	11
II.i Biología de la especie	11
II.ii Distribucion.....	12
II.iii Programa de manejo y conservación	13
ii.iv. El estrés y el eje Hipotálamo Hipófisiario Interrenal (HPI).	16
ii.v. El estrés y el eje Hipotálamo Pituitaria Gonadal (HPG).....	17
ii.vi Formacion de la gónada en etapa embrionaria	21
ii.vii Proliferacion celular gonadal	21
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS.....	23
IV.i Objetivo general.....	23
IV. ii Objetivos particulares.....	23
V. METODOLOGÍA	24
V .i Área de estudio.....	24
V. ii. La fluctuación de la temperatura del nido durante el periodo de incubación.	24
V. iii Colecta de las crías de <i>L. olivacea</i>	25
V. iv Animales de experimentación	26
V. v. Parámetros morfométricos de las crías de <i>L. olivacea</i>	26
V. vi. Niveles séricos de corticosterona en crías de <i>L. olivacea</i>	26
V. vii. Parámetros morfométricos gonadales de las crías de <i>L. olivacea</i>	27
V.viii Administración de 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU)	27
V.ix. Procesamiento histológico de las muestras	28
V.x. Procesamiento Inmunohistoquímico	28
V.xi. Análisis de resultados	29
V.xii Análisis estadístico.....	29
VI. RESULTADOS.....	30

VI.i Evaluación de la temperatura de incubación	30
VI.ii Parámetros morfométricos de crías de <i>L. olivacea</i> a la emergencia de nidos.	31
VI.iii Evaluación de los niveles séricos de corticosterona en crías de <i>L. olivacea</i>	32
VI.iv Evaluación de los parámetros morfométricos gonadales	32
VI.v Evaluación de la proliferación celular.....	34
VII.DISCUSION.....	36
VIII. CONCLUSIÓN	39
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	40

Resumen

La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, se encuentra en la categoría de riesgo según la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010). Con el fin de mantener estables sus poblaciones, se han implementado medidas de conservación. La principal, llevada a cabo en medio terrestre, implica el traslado de huevos recién ovipositados en sus nidos (NN), a nidos de vivero, hechos por el hombre (NHH). Recientemente, fue reportada la existencia de estrés crónico en *L. olivacea* durante el desarrollo embrionario en NH, incremento en los niveles de glucocorticoides y la desregulación del eje Hipotalámico-Pituitaria-Interrenal (HPI), con efectos sobre eje Hipotalámico-Pituitario-Gonadal (HPG). Herrera-Vargas *et al.*, (2017), observó, que al momento de la emergencia las gónadas masculinas de la tortuga Golfina presentan bajo peso testicular, así como menor densidad de células epiteliales en los cordones seminíferos. Esto en concordancia con trabajos que reportan el efecto negativo del estrés en el índice gonadosomático y la fertilidad en edad adulta de los individuos. Dado lo anterior y por la importancia del estatus de riesgo de la especie, es importante aportar información sobre el efecto que la incubación en NH tiene en la formación de las gónadas durante el desarrollo embrionario en *Lepidochelys olivacea*. En particular, el presente trabajo se planteó, evaluar el efecto de la incubación en NH sobre la proliferación de células germinales, aspecto de suma relevancia en el desarrollo de las mismas. Fueron utilizadas 3 crías provenientes de 6 nidos NN (n=18) y de 6 NH (n=18) al momento de la emergencia. La presencia de células germinales, se evaluó mediante la técnica de inmunomarcaje contra el marcador de proliferación celular 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU). Nuestros resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa en el total de células germinales en las gónadas de las crías provenientes de los NH. Esto sugiere que la reubicación de los huevos a NH genera un impacto negativo en la proliferación celular de las gónadas de *L. olivacea*, lo que muy probablemente podría estar afectando en un futuro la fertilidad de la especie.

Palabras clave: Glucocorticoides, Eje HPA, Eje HPG, Células germinales, Proliferación celular.

Abstract

Turtle *Lepidochelys olivacea*, is in the category of risk according to the Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010). In order to keep their populations stable, conservation measures have been implemented. The main, carried out in the middle ground, involves the transfer of newly oviposited eggs in their nests (NN), nursery nests, made by man (NHH). Recently, reported the existence of chronic stress in *L. olivacea* during embryonic development in NHH, increased levels of glucocorticoids and the deregulation of the axis hypothalamic-pituitary-Interrenal (HPI), with effects on axis hypothalamic axis hypothalamic-pituitary-Gonadal (HPG). Herrera-Vargas et al (2017), he noted, that the male gonads of the olive ridley turtle presented low testicular weight, as well as lower density of epithelial cells in the seminiferous cords at the time of the emergency. This in accordance with work reporting the negative effect of stress in the gonadosomatic index and fertility in adulthood of individuals given the above and given the importance of the status of risk of the species, is important to provide information upon the effect of incubation in NH in the formation of the gonads during embryonic development in *Lepidochelys olivacea*. In particular, the present work was raised, to assess the effect of incubation in NH on the proliferation of germ cell, aspect of utmost importance in the development of the same. They were used 3 pups from 6 nests NN (n = 18) and 6 NH (n = 18) at the time of the emergency. The presence of germ cells, was assessed using the technique of immunomarking against cell proliferation marker 5-bromo-2' - deoxyuridina (BrdU). Our results showed a statistically significant decrease in the total number of germ cells in the gonads of hatchlings from of the NH. This suggests that the relocation of eggs to NH generates a negative impact on cell proliferation in the gonads of *L. olivacea*, what likely could be affected in the future fertility of species.

Key words: glucocorticoid, HPA axis, axis HPG, germ cell and cell proliferation.

I. INTRODUCCIÓN

La Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*), se encuentra en la categoría de riesgo en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010). Debido a esto y con el fin de mantener estables sus poblaciones, así como las de otras especies de tortugas marinas, en México se han implementado durante décadas medidas de manejo y conservación. Dichas medidas se basan principalmente en la extracción de los huevos recién ovipositados por las hembras en sus nidos (NN), para posteriormente ser colocados en nidos hechos por el hombre (NH) en áreas protegidas de playa denominadas viveros. Sin embargo, ha existido polémica en cuanto a la eficiencia de dicha práctica; diversos trabajos han reportado efectos adversos en crías nacidas de NH, tales como malformaciones, efectos negativos sobre el éxito de eclosión (Eckert y Eckert 1990; Marcovaldi y Laurent 1996; Rees *et al.* 2002; Özdemîr y Türkozan 2006), la salud (Booth y Astill 2001), la proporción de sexos (Mrosovsky e Yntema 1980; Morreale *et al.*, 1982; Mrosovsky 2008, Pintus *et al.* 2009), el fenotipo de las crías (Reece *et al.*, 2002, Glen *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2007; Herrera-Vargas *et al.*, 2014), el tiempo de incubación y la pérdida del grado de sincronización al momento de emerger del nido (Koch *et al.*, 2006).

Recientemente se ha aportado información que lleva a pensar que la probable causa de todo lo anteriormente expuesto, es la exposición al estrés crónico en NH, durante el desarrollo embrionario/fetal. Herrera-Vargas *et al.*, (2017) reporta que bajo las condiciones de incubación en NH se genera exposición crónica al estrés, causando una desregulación del eje Hipotálamo-pituitario-interrenal (HPI), un aumento de los niveles de corticosterona en plasma, hipertrofia de las glándulas interrenales, hipotrofia neuronal en la corteza dorsal homóloga al hipocampo en mamíferos, así como, alteraciones en el crecimiento y maduración testicular de las crías. Esto último en concordancia con lo ampliamente estudiado en cuanto a que los niveles elevados de glucocorticoides de forma crónica, causan desregulación del eje Hipotálamo-Pituitario-Gonadal (HPG), lo que conlleva a alteraciones en los procesos celulares como la proliferación, migración y la diferenciación de las células germinales durante la formación, afectando el crecimiento y maduración de la

gónada, así como la fertilidad en diversas especies animales (Brennan y Blanche, 2004; Pieau *et al.*, 2004).

Dado todo lo anterior, el presente trabajo se planteó como objetivo, evaluar el efecto del estrés crónico embrionario asociado a la incubación en NH sobre la proliferación celular en las gónadas de *L. olivácea*, dada la importancia que una reproducción adecuada tiene en la sobrevivencia de las poblaciones de tortugas marinas en estatus de riesgo como es el caso de nuestra especie de estudio.

II. ANTECEDENTES

II.i Biología de la especie

La Tortuga Golfina (*L. olivacea*) es la más pequeña que hay en el Océano Pacífico, ya que sólo alcanza los 70 cm de longitud del caparazón y un peso promedio de 38.1 kg (33 – 52 kg; Márquez, 1996). Morfológicamente se caracteriza por tener un caparazón casi circular con quince escudos mayores, cinco dorsales y más de 5 pares laterales, aunque puede presentar desigualdad en el número de escudos en cada lado. Presenta una cabeza mediana y triangular así como un pico corneo. En la etapa adulta se pueden distinguir ambos sexos ya que existen caracteres sexuales morfológicos muy marcados. En los machos se puede distinguir el crecimiento de las uñas de las aletas anteriores, así como el alargamiento y ensanchamiento de la cola y un mayor tamaño con respecto a la hembra, en las cuales el tamaño de las uñas de las aletas y la cola es menor. Una vez alcanzada la longitud de 60 cm y el peso adecuado se pueden observar migraciones tanto de hembras como de machos, de las zonas de alimentación a las de reproducción donde se lleva a cabo el cortejo y la cópula en aguas poco profundas del mar.

Una vez terminada la etapa de copula las hembras arriban a la playa donde se lleva a cabo la ovoposición y anidación en nidos que realizan a una profundidad de 30 a 55 cm de profundidad a lo largo de la playa, durante los meses de junio a diciembre, y en casos extremos hasta enero. El número de huevos depositados por nidada puede ser de hasta 160, con una media de alrededor de 105, esto puede variar entre localidades reportado por la comisión de áreas protegidas (CONANP, 2008). Para realizar el nido, las tortugas comienzan a remover la arena tanto con las aletas anteriores como las posteriores, formando una oquedad llamada “cama”, donde cabe perfectamente el cuerpo de la tortuga. Posterior a esto comienza a cavar con las aletas posteriores una oquedad de mayor profundidad con forma de cántaro o de olla. Cuando este cuenta con la profundidad adecuada, empieza el desove. La profundidad y el tamaño del nido, le da cierta estabilidad en cuanto a la temperatura y la humedad para que los huevos se conserven en un ambiente relativamente estable para el desarrollo de los embriones. En general el nido puede presentar de

6° a 8°C menos durante el día y mantener una temperatura estable durante la noche, con respecto a la temperatura de la superficie. La forma del nido también tiene ventajas sobre los huevos, la hembra los realiza compactando la arena para evitar derrumbes hacia la cámara del nido, lo que podría ocasionar que los huevos sean aplastados. Una vez terminada la ovoposición la tortuga tapa el nido evitando dejar rastro alguno de la ubicación del mismo, con finalidad de evitar que los huevos sean encontrados por sus depredadores naturales (Figura 1).

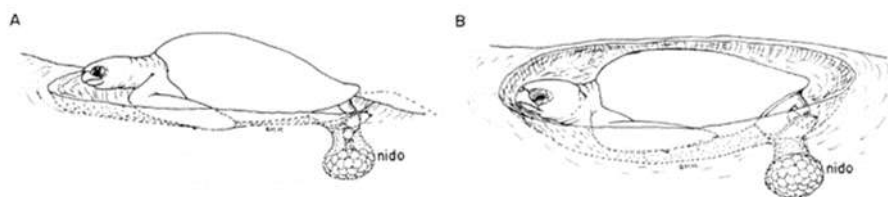


Figura 1. Representa esquemática. La forma del nido natural (NN) realizado por las tortugas Marinas

Por lo contrario se ha especulado que la arquitectura del nido natural difícilmente puede ser emulada por la mano del hombre. Se ha reportado que en los NH los embriones/fetos están expuestos a estrés mecánico, por temperatura y menor disponibilidad de oxígeno, en adición a las prácticas de manejo del vivero, que agudizan estas condiciones. El caminar constante entre los nidos genera mayor estrés mecánico por compactación de la arena; la densidad de nidos por unidad de área provoca el decremento en cuanto a disponibilidad de oxígeno y genera mayor calor metabólico (Chacon *et al.*, 2008).

II.ii Distribución.

La tortuga marina *L. olivacea* tiene una amplia distribución en los diferentes océanos de todo el mundo, debido a su gran capacidad migratoria. En México la podemos observar en diferentes partes del Pacífico Mexicano principalmente en las costas de Guerrero, Jalisco, Oaxaca y Michoacán (Figura 2); en estas regiones se

ha dado la explotación de tortugas marinas lo cual ha provocado la disminución de sus poblaciones (Márquez *et al.*, 1996).



Figura 2. Distribución de *L. olivacea* en los océanos del mundo. (Programa nacional para la conservación de tortugas marinas CONANP) y la distribución de *L. olivacea* en el Pacífico Mexicano. (Ochoa-Ochoa *et al.*, 2006).

II.iii Programa de manejo y conservación

Dentro de las zonas de distribución durante décadas se han establecido estrategias de manejo y conservación, debido a que en estas zonas existe sobreexplotación de las tortugas marinas y sus huevos, lo que ha generado graves daños en las poblaciones *L. olivacea*, colocando a esta especie bajo la categoría de riesgo de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010. Debido a lo anterior la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), en México ha implementado el programa de manejo y conservación y ha desarrollado acciones

que establecen estrategias en las prácticas de manejo y conservación, desde hace más de treinta años. Dicho programa da inicio con la formación campamentos de conservación y protección en las principales playas de anidación de tortugas cuya función principal es la protección de los huevos, vigilando los nidos naturales o trasladándolos a corrales o viveros y/o a cajas de incubación orientados a prevenir la extinción de las especies, promover la recuperación y el sostenimiento de poblaciones saludables de tortugas marinas a fin de que estas realicen eficientemente sus funciones ecológicas (Eckert *et al.*, 1999, Ríos y Briseño 1985, Márquez 1978).

Esta medida implica el expolio (desentierro o apropiación), traslado, manejo y re-entierro de los huevos a nidos hechos por el hombre (NHH) en viveros, los cuales son construidos en la misma playa bajo estándares internacionales (Van De Merwe *et al.*, 2002; 2005). Durante dichas maniobras, los huevos son trasladados y expuestos a movimientos de rotación y/o vibración causada por la manipulación lo cual se ha reportado afecta negativamente el desarrollo embrionario de los organismos y genera alta mortalidad (Aubret *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, la exposición a la intemperie provoca la desecación del mucus transparente que recubre los huevos de tortuga, el cual posee propiedades anti-patógenas (Phillot y Parmenter, 2012). Aunado a lo anterior, la arquitectura del NHH es diferente de aquella del nido natural (NN), construido por la hembra anidante (Tuttle y Rostal, 2010).

En párrafos anteriores hemos mencionado estudios que aportan información sobre el efecto negativo de la incubación en nidos artificiales. En cuanto a la fisiología, recientemente se han realizado estudios que sugieren que durante el desarrollo embrionario de las crías de tortuga marina *L. olivacea* en NH genera un incremento en los glucocorticoides, hipotrofia de glándulas adrenales, un fuerte efecto en la disminución del peso testicular y la disminución del área nuclear de las células epiteliales de los cordones seminíferos, indicando hipotrofia gonadal en crías al momento de la emergencia (Figura 3). Es mostrado de esta manera, que el incremento de los niveles de los glucocorticoides como producto final de la

activación del eje Hipotalámico Hipofisiario Adrenal (HPA) tiene efectos en otros sistemas fisiológicos como el eje Hipotalámico-Pituitaria-Gonadal (HPG; Herrera-Vargas *et al.*, 2017).

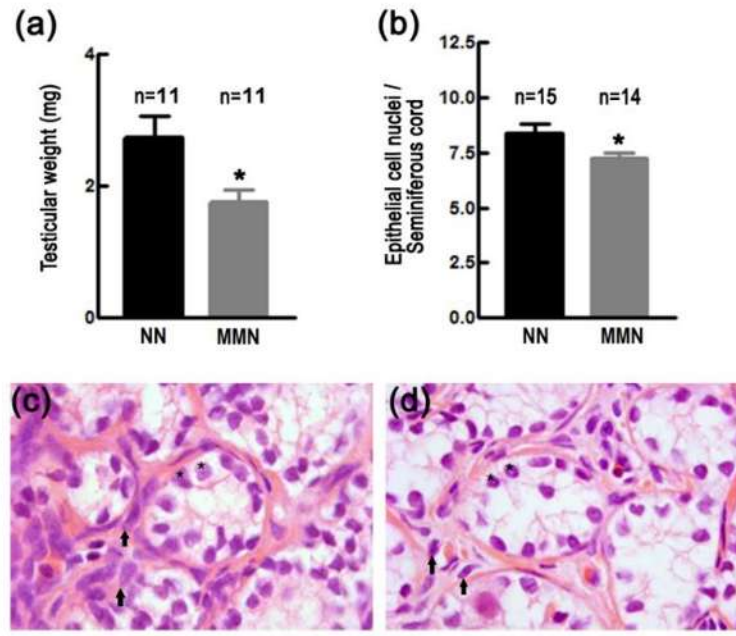


Figura 3. Las crías nacidas de NH muestran testículos hipotróficos. A) La gráfica de barras representan el peso testicular (ANOVA anidada $F_{1, 21} = 8.0317$, * $p < 0.01$) y B) La cantidad de células epiteliales por cordón seminífero (ANOVA anidado $F_{1, 23} = 4.8445$, * $p < 0.05$) en tortugas recién nacidas de nidos naturales (NN) y artificiales (AN). Fotomicrografías de secciones histológicas mostrando células epiteliales en conductos seminíferos de crías de NN © y NH (D). Tinción con hematoxilina-eosina. Barra de escala = 20 μ m (Herrera-Vargas *et al.*, 2017).

De la misma manera y con el fin de corroborar si los efectos observados en las crías persistían en el tiempo, fue evaluado el peso testicular en juveniles de 5 meses de edad (Bucio-Piña, 2017, *en proceso*; Figura 6). Los resultados de este trabajo fueron congruentes con las observaciones de Herrera *et al.*, 2017: hipotrofia significativa de células germinales NH con respecto de NN.

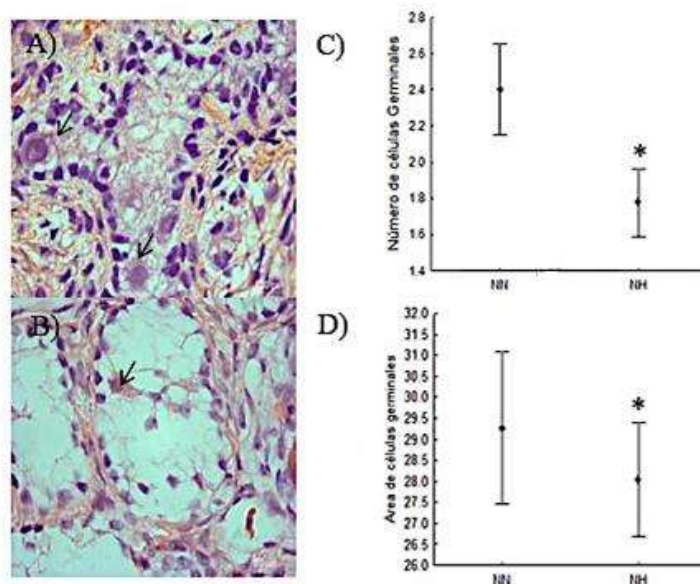


Figura 4 Las tortugas incubadas en nidos hechos por el hombre (NH) presentan menor densidad e hipotrofia de las células germinales. Fotomicrografías representativas de las glándulas gonadales masculinas incubadas en NN (A) y NH (B). Barra de escala = 20µm. C) Gráfica que muestra el número de células germinales (Anova anidado $F_{(1,187)}=15.294$, $*p<0.001$). D) Gráfica que muestra el área de las células germinales (Anova anidado $F_{(2,186)}=8.4549$, $*p<0.001$) (Bucio-Piña *en preparación*, 2018).

II.iv. El estrés y el eje Hipotálamo Hipófisiario Interrenal (HPI).

Como lo mencionamos con anterioridad el estudio de Herrera Vargas et al., 2017 sugiere que las crías de *L. olivacea* son expuestas a un estrés crónico durante el desarrollo embrionario en NH. El estrés es definido como un estado que amenaza la homeostasis del organismo, el cual es contrarrestado por una serie de respuestas fisiológicas, que tienen como propósito de re-establecer el equilibrio perturbado dado. Dichas respuestas al estrés están mediadas por el eje hipotálamo-hipófisis-interrenales (HPI), en reptiles también denominado eje Hipotálamo-hipófisiario-Adrenal (HPA) o eje del estrés, el cual consiste en un circuito neuroendocrino que se activa debido a un estímulo estresante, lo que conduce a la activación de neuronas secretoras de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y hormona

vasopresina (AVP), desde el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. CRH y AVP viajan a través de circulación hipotálamo-hipofisaria hasta la adenohipofisis donde se unen a sus receptores e induce la liberación de la hormona adrenocorticotropica (ACTH). Esta es liberada a circulación sistémica uniéndose a sus receptores en la corteza interrenal estimulando de tal forma la liberación de Glucocorticoides (GCs), los cuales se unirán a sus receptores localizados tanto en estructuras cerebrales como en la periferia. Los glucocorticoides circulantes se regulan a través de un asa de retroalimentación negativa con la finalidad de regular la liberación excesiva de los glucocorticoides (Figura 5). Sin embargo, durante el estrés crónico los niveles de glucocorticoides permanecen elevados lo cual se ha relacionado con afecciones sobre otros sistemas fisiológicos conduciendo a una serie de cambios o alteraciones en su funcionamiento con diversas patologías asociadas a corto y largo plazo (Hoon Son *et al*, 2011; Brunson *et al.*, 2003; Tsigos y Chrousos, 2002).

II.v. El estrés y el eje Hipotálamo Pituitaria Gonadal (HPG)

El estrés provoca la activación del eje HPA e impacta e la función del eje HPG, en este último caso, el primer lugar en el que se observan sus efectos es en la región del núcleo paraventricular (pPVN) en el hipotálamo debido a la activación de las neuronas secretoras de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) incrementando la producción de CRH, el cual interactúa por la vía corta con las *β -endorfinas* y estas a su vez con las neuronas secretoras de gonadotropinas. Con ello se activa una segunda vía de señalización que es más larga, la cual involucra la activación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), generando alteraciones en el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HPG en sus múltiples niveles. En el hipotálamo, se lleva a cabo la inhibición de la actividad de las neuronas las cuales secretan GnRH hacia las terminales de la eminencia media (ME). En la glándula pituitaria anterior se inhibe la estimulación de la síntesis y liberación de la hormona leutinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) las cuales tienen efecto directamente en órganos blanco como las gónadas; en los

testículos se disminuye la funcionalidad de las células de Leydig y como consecuencia la disminución en la producción de testosterona así como la espermatogénesis. Por otro lado, en el ovario se afecta los niveles en la producción de hormonas como el estradiol (E2) y la progesterona por el cuerpo lúteo, así como, los factores de crecimiento los cuales están involucrados en la maduración del ovocito así como la ovulación y por último la activación de los receptores a glucocorticoides en los diferentes tipos celulares del ovario (Figura 6; Whirledge y Cidlowski, 2010; Brunton, 2013, 2015).

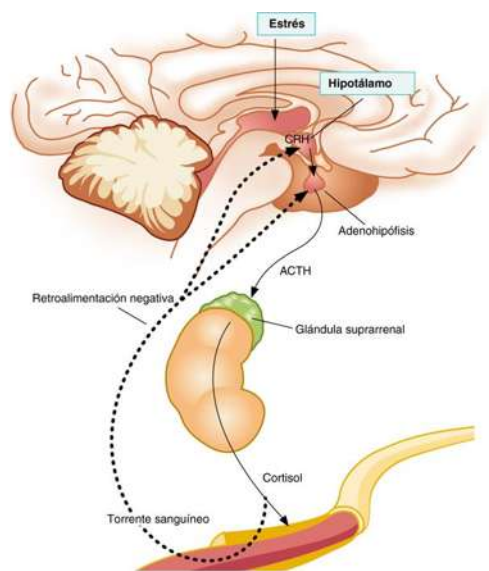


Figura 5. Representación esquemática del eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal en vertebrados. El estímulo externo percibido como estresor inicia una cascada de eventos, los cuales generan la activación del sistema nervioso y la secreción aumentada del factor de liberación de la hormona corticotrópica (CRH) y vasopresina (AVP) de las neuronas del hipotálamo. La activación simpática inicia la liberación de catecolaminas de la médula adrenal, las cuales actúan sobre varios órganos y tejidos blancos. A su vez, la CRH y la AVP estimulan un aumento en la secreción y liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) de la glándula hipófisis anterior, la cual estimula la secreción y liberación de glucocorticoides (GC) de la zona fasciculada de la corteza de la glándula adrenal. Los GC, como el cortisol, actúan en una gran variedad de tejidos y órganos blancos, con la finalidad de que los organismos recuperen la homeostasis (Matteri *et al.*, 2000. Imagen modificada de <https://a3nutricion.wordpress.com/tag/eje-hpa/>).

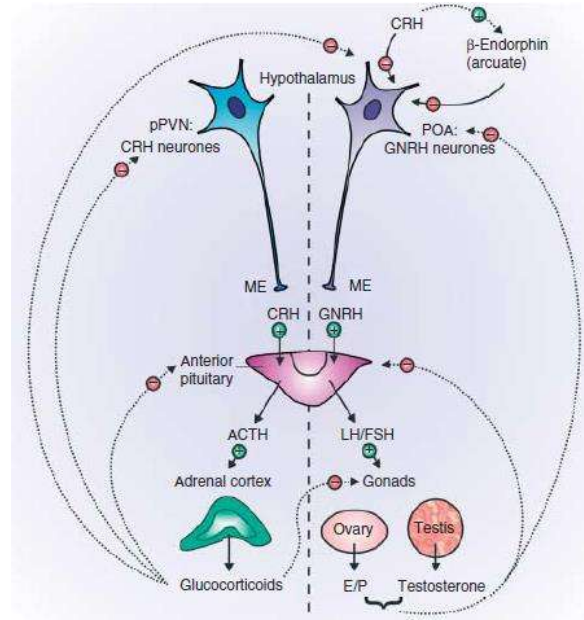


Figura 6. La interacción entre el eje Hipotalámico-Pituitaria-Adrenal (HPA) y el eje Hipotalámico-Pituitaria-Gonadal (HPG). La interacción entre ambos ejes se da a partir de la actividad de los glucocorticoides entre ambos ejes; los cuales afectan la función del eje HPG en múltiples niveles, en el hipotálamo (para disminuir la síntesis y liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)); la glándula pituitaria (para inhibir la síntesis y liberación de LH y FSH); el testículo y ovario (para modular la esteroidogénesis y/o gametogénesis directamente. Figura tomada de Brunton., 2013).

En mamíferos, diversos estudios han mostrado que la liberación de las hormonas secretadas durante las respuestas de estrés por el eje HHA, pueden inhibir la secreción y/o acción de las hormonas necesarias para la función gonadal y el comportamiento reproductivo (Rivier y Rivest, 1991; Viau, 2002). Se ha reportado que los fetos que son expuestos a factores estresantes, así como ambientes inadecuados y agentes químicos dañinos, sufren alteraciones que inhiben la actividad normal de las gónadas, dando como consecuencia alteraciones en el desarrollo sexual y en el comportamiento del individuo adulto. Asimismo, se ha

observado que una exposición prenatal al estrés en ratas macho conduce a un menor índice gonadosomático (Dahlof *et al.*, 1978, Rodríguez *et al.*, 2007, Kapoor y Mathews 2008). Estos efectos son causados por la interacción de los glucocorticoides y el eje gonadal generando efectos negativos en la producción y liberación de las hormonas esteroideas sexuales (Rivier y Rivest, 1991; Viau, 2002),

En una amplia variedad de especies de reptiles, se han observado diversos efectos en respuesta a estrés: baja gametogénesis (*Mabuya carinata*, Yahurvedi *et al.* 2003), baja espermatogénesis (*Anolis sagrei*, Tokarz, 1987), así como el declive en los niveles plasmáticos de testosterona después de que son expuestos a distintos estresores (*Podarcis sicula sicula*, Manzo *et al.* 1994; *Urosaurus ornatus*, Knapp & More, 1997; *Egernia whitii*, Jones & Bell, 2004; *Tamnophis sirtalis parietalis*, Moore *et al.*, 2000; *Tamnophis sirtalis concinnus*, Moore *et al.*, 2001; *Boiga irregularis*, Moore *et al.*, 2005; *Mabuya carinata*, Yajurvedi y Menon, 2005), o expuestos a implantes de la hormona Corticosterona en machos (*Uta stansburiana*, DeNardo y Licht, 1993; *Urosaurus ornatus*, Knapp & Moore, 1997; *Mabuya carinata*, Yajurvedi y Nijagal, 2000). En hembras, se han reportado una baja tasa de recrudescencia ovárica en *Anolis carolinensis* (Crews, 1974); bajo peso testicular y baja gametogénesis en *Mabuya carinata*, (Yahurvedi *et al.*, 2003); baja espermatogénesis en *Anolis sagrei* (Tokarz, 1987) y el declive en los niveles plasmáticos de testosterona en especies como *Podarcis sicula sicula*, *Urosaurus ornatus*, *Tamnophis sirtalis concinnus* relacionado a altos niveles de glucocorticoides en plasma (Manzo *et al.*, 1994; Knapp y More., 1997; Moore *et al.*, 2001).

II.vi Formación de la gónada en etapa embrionaria

Dentro de los nidos el desarrollo de los embriones de *L. olivacea* dura aproximadamente 45 a 60 días. Durante este periodo ocurre la formación de la gónada a partir del engrosamiento del epitelio celómico en la superficie ventromedial de los riñones mesonéfricos en la parte dorsal del mesenterio, en el cual se encuentran dispersas las células germinales primordiales. Las células germinales primordiales migran hacia la periferia de epitelio engrosándolo para formar la cresta gonadal que dará origen a la gónada primordial. En esta, las células germinales darán origen a las células que conforman la medula y la corteza de la gónada, de esta manera la gónada ya está formada y es bipotencial, es decir, puede seguir dos rutas de diferenciación sexual dependiendo de la temperatura ambiental, lo cual se lleva a cabo durante el periodo termosensible (TSD), considerado como, el periodo durante el cual la gónada es sensible a la temperatura ambiental, misma que determina la diferenciación sexual (Merchant-Larios *et al.*, 1998; Merchant-Larios *et al.*, 2010;). Temperaturas de 32-33°C producirán hembras mientras que temperaturas de 26-27°C producirán machos. La proporción sexual esperada sería de 1:1 (Bull *et al.*, 1982), sin embargo, esta proporción puede tener variaciones dependiendo la playa y el mes en que sea la anidación.

II.vii Proliferación celular gonadal

Durante el desarrollo embrionario y formación de las gónadas, tiene lugar el mecanismo de proliferación celular, en el cual las células germinales proliferan y dan origen a células precursoras de los espermatozoides y los óvulos. Para que esto suceda de manera “normal” deben existir condiciones óptimas de homeostasis, debido a que las células germinales contienen valiosa información genética que será transmitida a su descendencia. La proliferación celular, interviene en múltiples funciones durante el desarrollo, la formación, el crecimiento y diferenciación de la gónada, incluyendo la gametogénesis y la esterogénesis, mecanismos involucrados en el desarrollo, diferenciación, crecimiento y maduración de las gónadas. Todo lo anterior esencial para mantener la fertilidad de los individuos y por ende la estabilidad de sus poblaciones (Luo *et al.*, 2014; Shaha *et al.*, 2010).

El proceso de proliferación de células germinales subyace a la diferenciación de la gónada durante el desarrollo embrionario y se conserva en todos los vertebrados (Crews 2008). Existen reportes que indican que la inhibición de la proliferación antes o después de este período crítico conduce a deficiencias en el crecimiento y la maduración de la gónada (Bo Liang *et al.*, 2013; Whirledge y Cidlowski, 2010; 2013)

Se ha documentado que los glucocorticoides inhiben e índice de proliferación celular gonadal, debido a que incitan a la activación del sistema de apoptosis celular, la disminución de los niveles en factores de crecimiento y la relación estradiol/progesterona (E2/P4; Pieau *et al.*, 1999; Brennan y Blanche, 2004; Whirledge y Cidlowski, 2010; Liang *et al.*, 2013; 2016).

Hasta el momento no existen estudios que muestren evidencia de los efectos del estrés prenatal asociados a la incubación en NH sobre aspectos celulares de las gónadas en las crías de *L. olivácea*, en particular sobre la proliferación de células germinales durante el desarrollo embrionario. Se ha reportado, que el estradiol (E2), juega un papel relevante en la proliferación celular del ovario, niveles por arriba de lo “normal” ocasionan una drástica disminución en la proliferación celular de las gónadas durante el TSD generando gónadas hipoplásicas. Aunque las células primordiales se movilizan de la médula hacia la corteza conduciendo a la diferenciación ovárica, se ve afectada la red de proliferación observándose una disminución de células germinales en la gónada (Díaz-Hernández *et al.*, 2015; Wall *et al.*, 2014). Los glucocorticoides regulan mecanismos de proliferación, migración y diferenciación celular en las gónadas, afectando la secreción de hormonas durante el desarrollo, crecimiento, maduración de la gónada y la reproducción (Dorman *et al.*, 2003; O’Shaughnessy *et al.*, 2005; Whirledge y Ciddluwski 2010; Liang *et al.* 2013; Joseph y Whirlegge 2017)

III. HIPÓTESIS

Dados los efectos del estrés crónico embrionario causado por la incubación de huevos de la tortuga marina *Lepidochelys olivácea*, en nidos hechos por el hombre (NH), en las diferentes esferas fisiológicas de los individuos, nuestra hipótesis es que la incubación en NH tendrá también efecto en la disminución de la proliferación de células germinales en las gónadas de las crías.

IV. OBJETIVOS

IV.i Objetivo general

Evaluar el efecto del estrés causado por la incubación en nidos hechos por el hombre (NH) y nidos naturales (NN), sobre parámetros morfológicos y la proliferación celular en las gónadas de crías de *L. olivacea* al momento de la emergencia del nido.

IV. ii Objetivos particulares

- i. Monitorear la temperatura durante el proceso de incubación en NH y NN
- ii. Evaluar los niveles de corticosterona en la sangre al momento de la emergencia en crías de *L. olivacea*.
- iii. Evaluar los parámetros morfométricos de las crías de *L. olivacea* colectadas al momento de la emergencia
- iv. Determinar el peso de los conductos urogenitales de las crías de *L. olivacea* al momento de la emergencia.
- v. Evaluar la tasa de proliferación de células germinales en las gónadas de *L. olivacea* al momento de la emergencia. .

V. METODOLOGÍA

V. i Área de estudio

El presente estudio se realizó en el campamento tortuguero “Boca Seca” en el Municipio de Lázaro Cárdenas, Michoacán (Figura 7), ubicado a $18^{\circ} 04' N$ y $102^{\circ} 58' W$ y una altura de 20 msnm, con un clima cálido sub-húmedo, temperatura media anual de $27.8^{\circ}C$ y con lluvias en verano (precipitación pluvial anual de 1,276.8 mm) (SEDESOL).

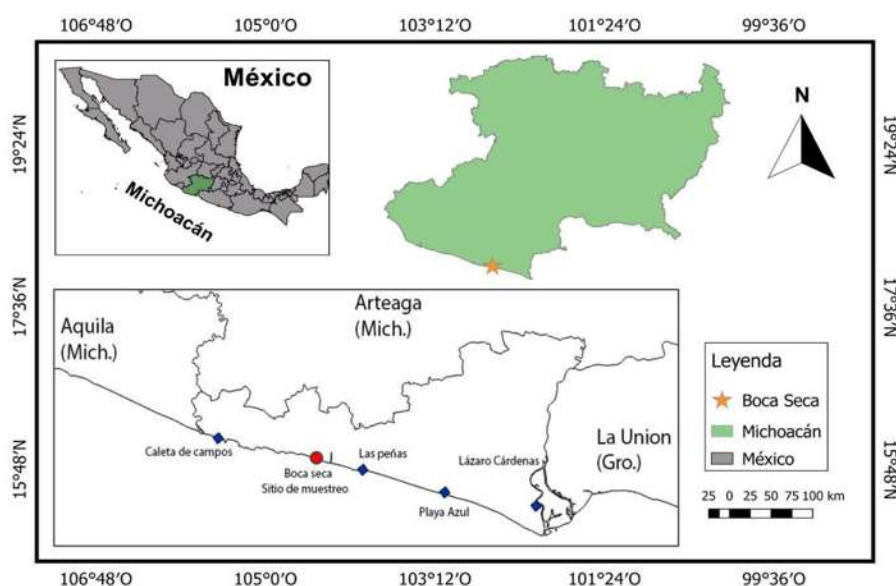


Figura 7. Ubicación geográfica del sitio de muestreo. El sitio de muestreo Boca Seca se encuentra ubicado en el municipio de Lázaro Cárdenas Michoacán, entre las comunidades de las Peñas y Caleta de Campos.

V. ii. La fluctuación de la temperatura del nido durante el periodo de incubación.

La temperatura de incubación se midió a través de hobos (Marca ONSET, modelo logger. Temperature/ light 64k) colocados dentro de cada uno de los dos tipos de nidos (NN $n=6$; NH $n=6$). Los Hobos comenzaron a registrar de manera continua la temperatura cada hora a lo largo del día y durante la noche, con la finalidad de determinar la fluctuación interna del NN con respecto al NH. El intervalo de días seleccionado para monitorear este parámetro fue del día 17 al 45, dado que esta ventana de tiempo abarca el periodo termosensible (PTS) durante el

periodo de incubación, periodo en el cual la temperatura juega un papel determinante en la diferenciación sexual de la gónada.

V. iii Colecta de las crías de *L. olivacea*

La colecta de las crías de tortuga marina *L. olivacea* se realizó a finales de octubre y principios de noviembre del 2017 en el campamento Boca Seca Mpio de Lázaro Cárdenas, Michoacán. Se seleccionaron nidos hechos por el hombre (NH n=6) en el área de vivero del campamento, esto fue hecho al azar. De estos se colectaron 10 crías en cada uno de ellos obteniendo un total de 60 crías. De la misma manera fueron seleccionados nidos naturales (NN n=6) ubicados a lo largo de la playa en cada uno de los cuales se colectaron 10 crías en cada uno de los nidos obteniendo un total de 60 crías, obteniendo un total de 120 crías. Del total de las crías colectadas se tomó una muestra aleatoria para cada experimento el procedimiento se encuentra resumido en la Figura 8

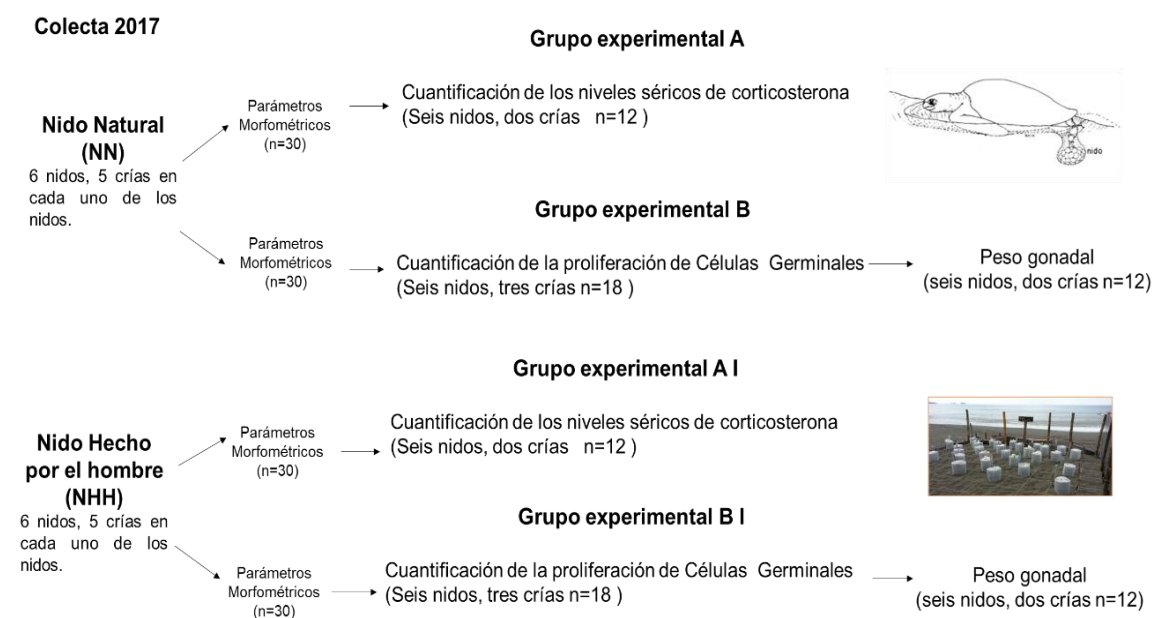


Figura 8. Esquema del diseño experimental. El esquema muestra la distribución de los organismos y muestras representativas procesadas para cada uno de los experimentos realizados en la colecta 2017.

V. iv Animales de experimentación

Los procedimientos de muestreo y sacrificio se realizaron siguiendo los protocolos del Comité de Derechos de los Animales de SEMARNAT bajo el número de licencia SGPA / DGVS / 05459/13, SGPA/DGVS/10395/17; y en total acuerdo con el Diario Oficial Mexicano Norma, NOM-033-ZOO-1995 para el sacrificio humanitario de animales domésticos y salvajes. El procesamiento de las muestras obtenidas se realizó en el Laboratorio de Ecofisiología Animal del Instituto sobre los Recursos Naturales (INIRENA) perteneciente la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

V. v. Parámetros morfométricos de las crías de *L. olivacea*.

Las medidas morfométricas fueron tomadas a la emergencia de las crías de *L. olivacea*, se utilizó un vernier digital (Marca: Mitutoyo, No. de serie: 13035031). Las medidas tomadas fueron: longitud del organismo, longitud del caparazón, longitud del peto, anchura de caparazón, anchura del peto y peso corporal (este último fue obtenido con una pesola marca linghline 50g), se consideraron 120 crías colectadas en NN (n=6) y NH (n=6).

V. vi. Niveles séricos de corticosterona en crías de *L. olivacea*.

En campo el suero sanguíneo de cada muestra fue obtenido por centrifugación, en una microcentrífuga portátil (ThermoScientific), durante 15 minutos, a 2,000 rpm, a temperatura ambiente. Las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido, con la finalidad de mantener su integridad hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio, en, donde fueron almacenadas a una temperatura de -80°C, hasta el momento de su procesamiento usando la técnica de Elisa. Para lo anterior, se utilizó el kit de corticosterona (ALPCO, 55-CORMS-E01) siguiendo las instrucciones del mismo, se utilizaron 10 µl de suero por cada una de las muestras realizadas por duplicado. El suero se incubó en una microplaca la cual contenía el anticuerpo policlonal anti-corticosterona, se le adicionaron 10 µl de cada uno de los calibradores los cuales consisten en un gradiente de diferentes concentraciones (15, 50, 185, 640 y 2250 ng/ml) y así realizar una curva de

calibración. Adicional a ello se utilizó un control negativo en el cual se colocó solución PBS. Una vez preparadas las muestras se adicionaron 100 µl del buffer de incubación y 50 µl de enzima conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP) y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante; terminado el tiempo de incubación se descartó el contenido de las placas y se adicionaron 300 µl del buffer de lavado durante 4 veces, descartando el contenido. Posterior a ello se adicionaron 200 µl de la solución de sustrato y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente cubriendo la placa para evitar el contacto con la luz. Finalmente se agregaron 50 µl de *Solución Stop* para detener la reacción y se determinó la absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 450 nm en un *Microplate Reader Bio-Rad* (Modelo: iMark, No, de serie: 16912). Para la cuantificación de niveles séricos de corticosterona se consideró dos muestra de suero en NN (n=6) y NH (n=6).

V. vii. Parámetros morfométricos gonadales de las crías de *L. olivacea*.

Los parámetros morfométricos gonadales que se consideraron para este estudio, fue el peso del conducto urogenital (mesonefro-gónada), el cual se obtuvo en balanza analítica (Marca: Ohaus, No, de serie: 8330390601) de tres crías del NN (n=6) y tres crías del NH (n=6); para el peso gonadal, se consideró solo la gónada de dos crías del NN (n=6) y dos crías del NH (n=6) y se obtuvo en ultra micro balanza (Marca: Metter Toledo, No. de serie: 1122451222) y la finalmente el área gonadal se realizó en cortes histológicos de tres crías del NN (n=6) y tres crías del NH (n=6) con ayuda del programa *ImageJ*.

V.viii Administración de 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU)

En campo se les administró 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU) a cinco crías de NN (n=6) y NH (n=6) mediante inyecciones vía intraperitoneal en una concentración de 100 mg/Kg al momento de la eclosión y una segunda dosis a las 2 horas posteriores con el objetivo de marcar las células en proliferación y a las 4 horas posteriores a la primera administración las crías fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico y fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% para

posterior transportación al laboratorio, en donde fueron procesadas (Yurkewicz y Cols, 1981)

V.ix. Procesamiento histológico de las muestras

Los conductos urogenitales de tres crías NN (n=6) y tres crías del NH(n=6) fueron disectados y pos-fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% para mantener la integridad del tejido. Se obtuvo el peso del conducto urogenital el cual se obtuvo en balanza analítica (Marca: Ohaus, No, de serie: 8330390601), posteriormente se procesaron en una serie de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones 10%, 20%, 30% y finalmente se colocaron en una solución 1:1, es decir, 50% de sacarosa al 30% y 50% de *Tissue-Tek*®, hasta el momento de procesamiento inmunohistoquímico con inmunomarcaje anti BrdU, procesando un total de 18 para NN y 18 para el NH.

Los cortes histológicos del complejo urogenital se llevaron a cabo en un criostato (marca: Zeiss, No de serie: 43964) con un grosor de 20µm los cuales se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su procesamiento inmunohistoquímico.

V.x. Procesamiento Inmunohistoquímico

El procesamiento inmunohistoquímico de los cortes realizados al conducto urogenital se realizó con el inmunomarcaje anti-BrdU en laminillas gelatinizadas para evitar el desprendimiento de los tejidos durante el proceso inmunohistoquímico, de la siguiente manera: los cortes de tejido se lavaron con agua destilada por 10 min para eliminar los restos del *Tissue-Tek*®; posteriormente, los tejidos se lavaron en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se incubaron en Inmuno DNA retriever 20X with Citrate (Bio SB) durante 30 min, posteriormente en HCl 2N a una temperatura de 36-37°C durante 30 minutos; ambos procesos abren los poros de membrana nuclear, lo cual permite que el anticuerpo anti-BrdU penetre hasta el ADN. Para neutralizar el ácido se utilizó buffer de borato al 0.1M posterior a la neutralización. Se realizaron lavados con alcohol en concentraciones ascendentes del 25%, 50%, 75% y absoluto con la finalidad de deshidratar el tejido. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó incubando los

tejidos durante 30 minutos con albúmina bovina (0.1%). La incubación con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (1:500) (Roche Diagnostic) fue por 16 horas a 4°C. Consecutivamente los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado Anti-ratón IgG (1:500) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados en PBS y se incubaron con el complejo AB (complejo de avidina biotina) al 0.9% (Vectastain PK-4000), por 90 minutos y la inmunoreacción se reveló con diaminobenzidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

V.xi. Análisis de resultados

El conteo de las células inmunomarcadas con anti-BrdU se realizó seleccionando 5 cortes tomados al azar por laminilla de tres crías NN (n=6) y NH (n=6), así como la toma de microfotografías bajo el microscopio óptico (Marca: Leica No de serie DM3000) con el apoyo del Software *Leica Application Suite* (LAS), en el objetivo de 10X y 40X y corroborado con el programa *ImageJ*.

V.xii Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante una ANOVA anidada en el programa *Statistica versión 7* y un análisis de componentes principales en el programa estadístico *Frata escort*. Para la presentación gráfica de los resultados se utilizó el software *GraphPad Prism 7*. La ANOVA anidada es una prueba estadística que se utiliza en situaciones de presencia de subgrupos dentro de grupos (tipo de nido NN y NH) con el objetivo determinar la diferencia entre los promedios de los subgrupos así como de los grupos (Badii *et al.*, 2014).

VI. RESULTADOS

VI.i Evaluación de la temperatura de incubación

Los análisis estadísticos mostraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del período de incubación entre los seis NH y NN mostrando una diferencia estadísticamente significativa de (Wald $X^2(17)=274.09$, $**p=0.001$), en las temperaturas registradas durante el período termo sensible, mostraron un decremento en los NH (32.224 ± 0.076 °C) con respecto a los registrados en NN (32.703 ± 0.035) (Figura 9).

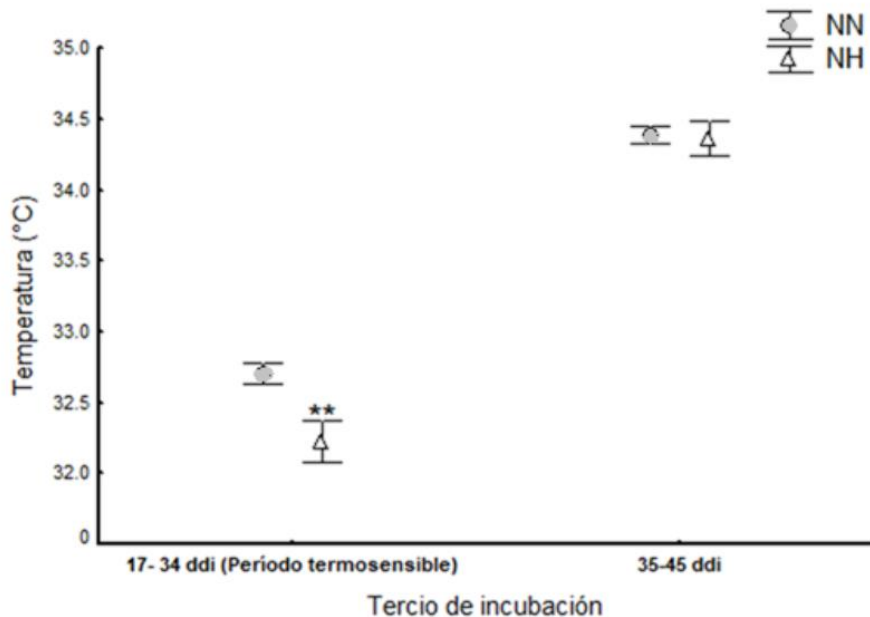


Figura 9. Registro de la temperatura dentro del nido natural (NN) con respecto al nido hecho por el hombre (NH). La grafica representa el promedio de las temperaturas ($\pm$ ES) registradas en 6 NN y 6 NH durante el curso del período termosensible y hasta el último tercio de incubación de *L. olivacea*.

VI.ii Parámetros morfométricos de crías de *L. olivacea* a la emergencia de nidos.

Cada una de las variables morfométricas analizadas presento diferencia estadísticamente significativa entre tipos de nido (Figura no mostrada). Dichas variables, evaluadas mediante el análisis de componentes principales, se comportan de la siguiente manera: El componente 1, es decir la masa corporal, explica el 48.97% del total de la varianza con un valor de .854, seguido de la longitud total con un valor de .872, la longitud del caparazón con un valor de .798, el ancho del caparazón con un valor de .706 y ancho del peto con un valor de .692. La longitud del peto se encuentra igualmente representado en el componente uno y en el componente dos con un valor de .571 y -.562, respectivamente. El componente 2, explica el 15.98 % de la varianza 15.98 y está relacionado con las variables peso del vitelo con un valor .743 y longitud del peto con un valor -.562 (Figura 10).

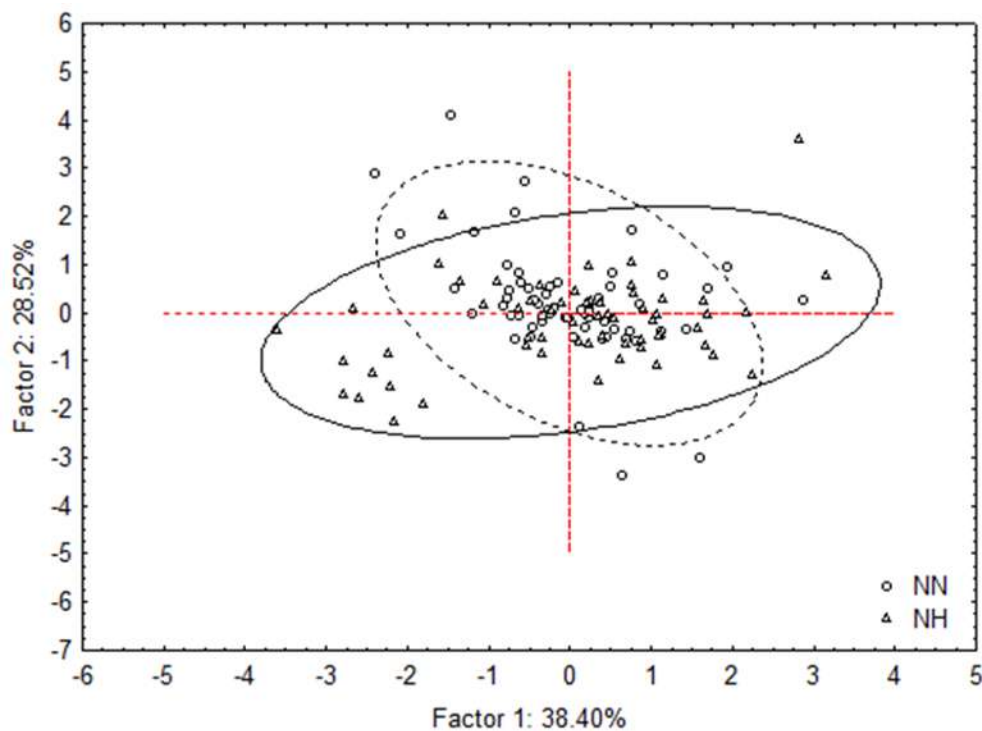


Figura 10. Analisis de componentes principales de las variables de las diferentes condiciones NH y NN. La grafica muestra el análisis de los componentes principales dada

por la varianza de las variables tomadas para cada individuo colectado del NN y NH, observando en el componente I la mayor variación está explicada por la masa corporal con un 48.97% y el componente II está explicado por una varianza de 15.98%.

VI.iii Evaluación de los niveles séricos de corticosterona en crías de *L. olivacea*

Los resultados de la cuantificación de corticosterona en suero obtenido de dos crías de *L. olivacea* al momento de la emergencia del NN (n=6) y NH (n=6) considerando un total de 24 muestras, para evaluar el efecto del estrés prenatal asociado a la incubación, observando que los niveles de corticosterona en ambos nidos no mostraron una diferencia estadísticamente significativa, $F_{(10, 12)} = 0.63897$ $p = 0.75704$.

VI.iv Evaluación de los parámetros morfométricos gonadales

Los análisis estadísticos mostraron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los conductos urogenitales de tres crías del NN ($0.064889 + 0.002823$) con respecto a las del NH ($0.057889 + 0.003083$), observando una diferencia estadísticamente significativa $F_{(1,10)} = 4.559$; $*p = 0.043$ (Figura 11 A); El peso gonadal tomado de dos crías del NN ($2.375667 + 0.245134$) con respecto al NH ($1.487583 + 0.141831$), observando una diferencia estadísticamente significativa $F_{(1,10)} = 9.409$; $*p < 0.01$ (Figura 11 B) y finalmente el área gonadal de tres crías del NN ($0.129842 + 0.011759$) y tres crías del NH ($0.0987814 + 0.005898$) no presenta diferencia estadísticamente significativa $Wald X^2(2) = 0.00002$; $p = .999$.

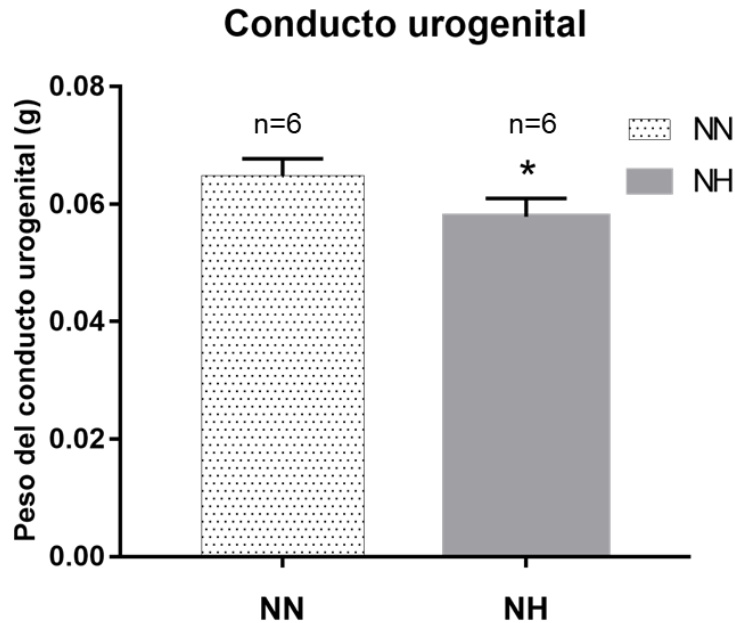


Figura 11 A). Parámetros morfométricos gonadales de crías emergidas del nido natural (NN) con respecto al (NH). La gráfica muestra el peso del conducto urogenital de NN (n=6) y NH (n=6) para los cuales se analizaron tres crías respectivamente. Los resultados se muestran con (promedios + error estándar).

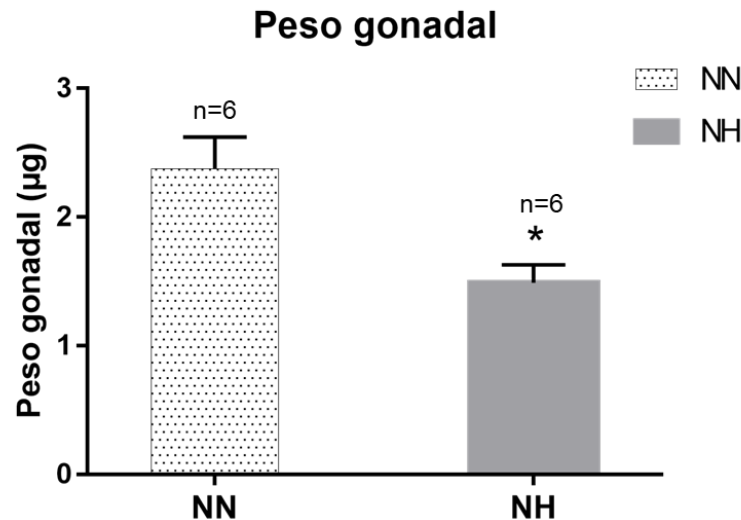


Figura 11 B). Parámetros morfométricos gonadales de crías emergidas del nido natural (NN) con respecto al (NH). La gráfica muestran el peso gonadal tomado de dos crías del NN (n=6) y NH (n=6), los resultados se muestran con (promedios + error estándar).

VI.v Evaluación de la proliferación celular

La proliferación de células germinales inmunoreactivas a BrdU en las gónadas femeninas de las crías de *L. olivacea* en el momento de la emergencia, en su mayoría se pueden observar en la capa columnar de la corteza, mostrando un incremento en el número de células marcadas en las gónadas de las crías provenientes del NN con respecto al NH (Figura 12 A y B). La grafica muestra los resultados obtenidos del conteo de las células germinales para obtener la densidad de células marcadas por mm^2 en las gónadas femeninas de las crías al momento de la emergencia con promedio y error estar de (572.6568 ± 69.12387) en el NN y para el NH (333.9361 ± 43.55503) , mostrando una disminución estadísticamente significativa $F_{(1, 10)} = 8.7353$; $*p = 0.007$) en un total de 36 muestras (Figura 12 C).

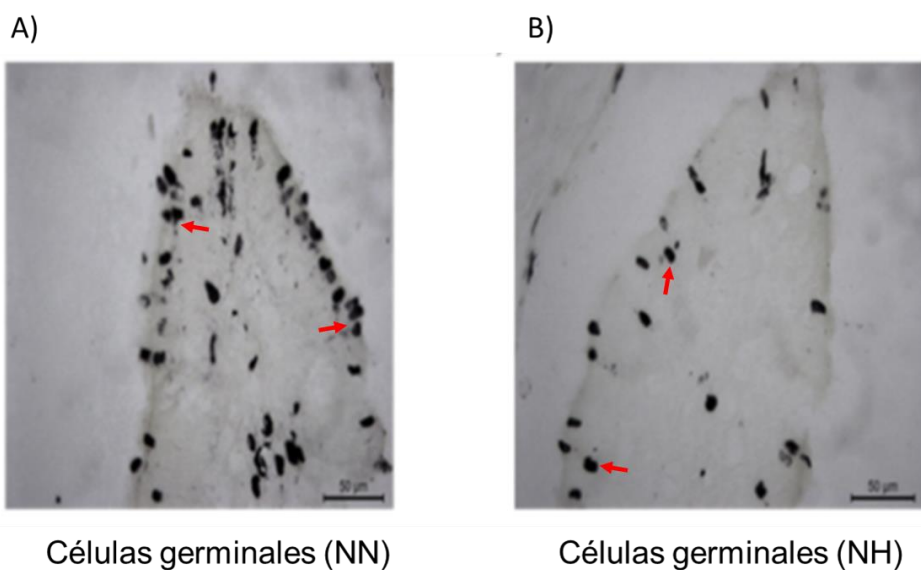


Figura 12 A) y B). Las microfotografías muestran de manera cualitativa las células germinales señaladas con la flecha roja en los cortes de las gónadas femeninas de las crías de *L. olivacea*. En la imagen A) Se observan las células inmunomarcadas con BrdU en las gónadas del NN y en la imagen B) Se observan las células inmunomarcadas con BrdU en las gónadas del NN.

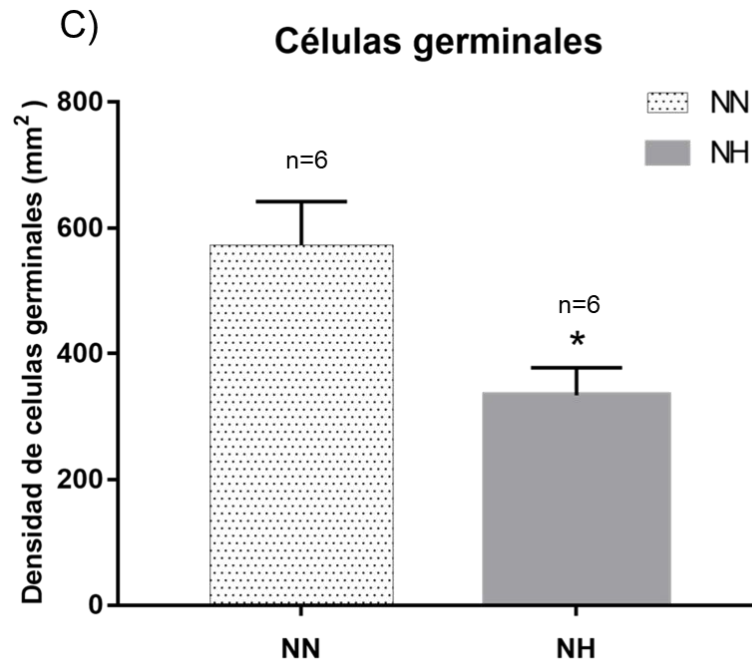


Figura. 12 C) Densidad de células germinales por mm^2 . La gráfica muestra la densidad de células germinales por mm^2 tomado de tres crías del NN (n=6) y NH (n=6), los resultados se muestran como promedios + error estándar de las muestras (ES) entre las crías nacidas NN y NH.

VII.DISCUSION.

Dada la importancia de la temperatura en el desarrollo embrionario, el desarrollo gonádico y el mecanismo de proliferación celular como lo hemos mencionado en la parte de antecedentes (Zhong-Rong *et al.*, 2011, C. Pieau *et al.*, 1999, Merchant-Larios *et al.*, 1997), se decidió monitorear este parámetro con el fin de evaluar si existían diferencias entre tipo de nido, que pudieran ser una probable fuente de estrés para los embriones/fetos de *L. olivacea*. El periodo registrado fue del día 17 de incubación (ddi) al día 45 de incubación (ddi), período que cubrió lo que se conoce como PTS, (días 17 al 35) Los resultados muestran que hay una diferencia estadísticamente significativa en este parámetro entre NN y NH justo durante el periodo termosensible, Sin embargo, sería muy aventurado decir que esto haya generado estrés y tenido efecto alguno sobre el índice de proliferación celular en la gónadas. Esto podría explicar por qué en la colecta para presente trabajo predominaron gónadas pertenecientes a hembras; debido a que nuestros resultados muestran temperaturas de 32°C, temperatura dentro del rango feminizante (32 a 33°C Bull *et al.*, 1982), rango que no es rebasado en el caso de NN que registra los valores de mayor intensidad de temperatura. A este respecto podemos mencionar que a pesar de que se ha tratado de dilucidar que variable es la que podría estar determinando o influenciando predominantemente como fuente de estrés en el ambiente incubatorio en NH no se han logrado resultados contundentes. Se ha planteado que no es posible considerar a la temperatura como un factor determinante y único de estrés durante el periodo de incubación, otros parámetros como humedad, estrés mecánico, disponibilidad de oxígeno, en su conjunto, y en general lo que se denominaría ambiente incubatorio, podría ser la fuente del estrés crónico que está afectando el desarrollo, crecimiento y formación en este caso de la gónada de *L. olivacea* (Herrera-Vargas *et al.*, 2017).

morfométricos evaluados, tales como la longitud total del organismo, longitud del caparazón, longitud del peto, anchura de caparazón, anchura del peto y peso corporal del total de las crías colectadas al momento de la emergencia (n = 60 para

cada tipo de nido), mostraron todos ellos, diferencias estadísticamente significativas en crías nacidas de NN con respecto a las nacidas de NH (figura no mostrada). En relación a esto, el análisis de componentes principales nos muestra que la masa corporal, explica el 48.97% del total de la varianza con un valor de 0.854, es decir es la variable que marca la diferencia mayor entre tipos de nidos, seguido de la longitud total, y luego la longitud y ancho del caparazón, teniendo un menor peso en ello variables tales como peso del vitelo. Lo anterior coincide con los trabajos realizados para *L. olivacea*, *C. mydas* y *C. caretta*, en los que han reportado una menor masa corporal y variaciones en el número de los escudos en nidos de vivero (Herrera-Vargas, 2017; Turkozan *et al.*, 2013; Sonmez *et al.*, 2011; Harris y Seckl, 2001; Mast y Carr, 1989; Hill, 1971).

En cuanto a la cuantificación de los niveles séricos de corticosterona en las crías de *L. olivacea* al momento de la emergencia, fue observado que los niveles en ambas condiciones no mostraron una diferencia estadísticamente significativa. En este sentido cabe mencionar que las medidas de cortisol y/o corticosterona basales y sus variaciones después de eventos estresantes suelen ser difíciles de establecer debido a la variabilidad individual en la respuesta a factores ambientales, fisiológicos (Hasegawa *et al.*, 1997; Bertoni *et al.* 2006 a) y la genética de los individuos (Weis *et al.* 2004; Kosti *et al.* 2006). Dado que se han reportado resultados contradictorios en diferentes especies de mamíferos en cuanto a su respuesta a estrés y en consecuencia en cuanto a valores séricos de cortisol en sangre, algunos autores han coincidido en señalar que el estrés crónico puede resultar “en una sensibilidad inicial de la glándula adrenal seguida de un decremento” (Rushen *et al.* 2007). Al parecer cuando el estímulo es demasiado intenso y sostenido la respuesta se va haciendo menos evidente en cuanto a niveles de cortisol en sangre, esto demostrado en el caso de ratas (Bertoni *et al.* 2005 b). Hemos de comentar que en el Laboratorio de Ecofisiología Animal, independientemente de la significancia de los resultados en diferentes temporadas de muestreo, se ha encontrado que los efectos negativos en los diversos órganos relacionados con el eje HPI se mantienen, como es el caso para el presente estudio en cuanto a valores morfométricos e índices de proliferación celular gonadal observados. Estudios más profundos sobre

las medidas de corticosterona en la sangre a lo largo del desarrollo embrionario de las crías y el establecimiento de sus niveles basales deben ser llevados a cabo.

El estrés genera efectos negativos en el peso del conducto urogenital (gónada-mesonefro) y la gónada (Díaz-Hernández *et al.*, 2015; Herrera-Vargas *et al.*, 2017). En el presente estudio ha sido posible observar una diferencia estadísticamente significativa en el peso del conducto urogenital el peso de las gónadas. Coincidiendo con lo observado en Herrera Vargas *et al.*, (2017), quien reporta que el peso testicular en tortugas recién emergidas de NHH es menor que el de la nacidas en NN.

Con respecto al objetivo central del presente trabajo, una vez evaluada la proliferación de células germinales en la gónada de las crías de *L. olivacea* al momento de la emergencia del nido, fue posible notar una diferencia estadísticamente significativa en la densidad de células en proliferación entre crías nacidas de diferente tipo de nido. Es decir aquellas nacidas de NH muestran un índice menor de proliferación con respecto a aquellas nacidas de NN. Estos resultados son de gran relevancia, ya que como lo mencionamos en párrafos anteriores, durante el desarrollo embrionario y formación gonadal tiene lugar el mecanismo de proliferación celular, en el cual las células germinales dan origen a células precursoras de los espermatozoides y los óvulos en las gónadas, proceso que se ha conservado en todos los vertebrados. (Bo Liang *et al* 2013). Para que esto suceda de manera “normal” deben existir condiciones óptimas de homeostasis, que al parecer ha sido interrumpida por efecto del estrés crónico durante la incubación en NHH. Existe abundante información de que la inhibición de la proliferación conduce a deficiencias en el crecimiento y la maduración de la gónada durante el desarrollo embrionario y más allá, la fertilidad y la reproducción en la etapa adulta de los individuos (Ramsey, Crews 2008; Whirlledge y Cidlowski 2010, 2013;). Dado el estatus de especie en riesgo de *L. olivacea*, pero sobre todo infiriendo que esto pudiera aplicarse para todas las especies de tortugas marinas incluyendo a aquellas que están en estatus de peligro crítico de extinción, estos

resultados son de gran relevancia, ya que estaría en juego la reproducción adecuada y por ende la supervivencia de las poblaciones.

VIII. CONCLUSIÓN

Los efectos fisiológicos del estrés crónico embrionario producido por la incubación en NHH sobre el eje Hipotalámico Hipofisiario Gonadal (HHG), afectan en procesos celulares varios, uno de ellos, la proliferación de células germinales en las gónadas con muy posibles consecuencias negativas en la maduración gonadal y funciones reproductivas en la vida adulta de *L. olivacea*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abreu-Grobois, A., y Plotkin, P. (2008). *Lepidochelys olivacea*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014. 3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on December 18th, 2014.

Adam, V., Tur, C., Rees, A. F., Tomas, J. (2007). Emergence pattern of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) hatchlings from Kyparissia Bay, Greece. *Marine Biology*, 151 (5), pp. 1743-1749.

Booth, D. T., & Astill, K. (2001). Temperature variation within and between nests of the green sea turtle, *Chelonia mydas* (*Chelonia: Cheloniidae*) on Heron Island, Great Barrier Reef, *Austrian Journal Zoology*, 49 (1), pp. 71-84.

Brennan, J., & Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, 5 (7), pp. 509-521.

Brunson, K. L., Chen, Y., Avishai-Eliner, S., & Baram, T. Z. (2003). Stress and the Developing Hippocampus A Double-Edged Sword. *Molecular Neurobiology*, 27 (2), pp. 121-136.

Brunton, P. J. (2013). Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction*, pp. 175-189.

Bull, J. J. (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Advanced Book Program. Menlo Park, Ca.

Chan, E. H., Salleh, H. D., & Liew, H. C. (1985). Effects of handling on hatchability of eggs of the leatherback turtle, *Dermochelys coriacea* (L.). *Pertanika*, 8 (2), pp. 265-271.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONAP). (2008). Programa de Monitoreo de la Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua. Recuperado de: <http://www.conanp.gob.mx/acciones/fichas/chacahua/info/info.pdf>.

Crews, D. (1974). Effects of group stability, male-male aggression and male courtship behavior on environmentally induced ovarian recrudescence in the lizard *Anolis corolinesis*. *Journal of Zoology London*, 172 (4), pp. 419-441.

Denardo, D. F., & Licht, P. (1993). Effects of corticosterone on social behavior of male lizard. *Hormones and Behavior*, 27 (2), pp. 184-199.

Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A., & Merchant-Larios, H. (2015). Exogenous estradiol alters gonadal growth and timing of temperature sex determination in gonads of sea turtle. *Developmental Biology*, 408 (1), pp. 79-89.

Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A., & Donnelly, M. (Editors). (1999). *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles* IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.

Eckert, K. L., & Eckert, S. A. (1990). Embryo mortality and hatch success in *In situ* and translocated leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea* eggs. *Biological Conservation*, 53 (1), pp. 37-46.

Ganesh, C. B., & Yajurvedi, H. N. (2003). β -Endorphin disrupts seasonal and FSH-induced ovarian recrudescence in the lizard *Mabuya carinata*. *General and comparative endocrinology*, 133 (3), pp. 305-313.

Glen, F., Broderick, A. C., Godley, B. J., & Hays, G. C. (2005). Patterns in the emergence of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) turtle hatchlings from their nests. *Marine Biology*, 146 (5), pp. 1039-1049.

González-Trápaga, R., Aguirre, G., & Adest, G. A. (2000). Sex-steroids associated with the reproductive cycle in male and female bolson tortoise, *Gopherus flavomarginatus*. *Acta zoológica mexicana*, (80), pp. 101-117.

Herrera-Vargas, M. A., Meléndez-Herrera, E., Gutiérrez-Ospina, G. & Fuentes-Farías, A. L. (2014). Efectos de la exposición prenatal al estrés asociado a la incubación artificial, sobre el desarrollo de la tortuga golfina. *Biologicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 16 (1), pp. 53-58.

Herrera-Vargas, M. A., Meléndez-Herrera, E., Gutiérrez-Ospina, G., Bucio-Piña, F. E., Báez-Saldaña, A., & Fuentes-Farías, A. L. (2017). Effects of egg relocation and incubation in man-made nests on the stress response of marine turtle hatchlings. *Frontiers in Marine Science*, 4, pp. 1-8.

Jones, S. M., & Bell, K. (2004). Plasma corticosterone concentrations in males of the skink *Egernia whitii* during acute and chronic confinement, and over a diel period. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137 (1), pp. 105-113.

Kapoor, A., & Matthews, S. G. (2008). Prenatal stress modifies behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal function in female guinea pig offspring: Effects of timing of prenatal stress and stage of reproductive cycle. *Endocrinology*, 149 (12), pp. 6406-6415.

Knapp, R., & Moore, M. C. (1997). Male morphs in tree lizards have different testosterone responses to elevated levels of corticosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 107 (2), pp. 273-279.

Koch, V., Nichols, W. J., Peckham, H., & De La Toba, V. (2006). Estimates of sea turtle mortality from poaching and by catch in Bahia Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Biological Conservation*, 128 (3), pp. 327-334.

Kyrou, I., & Tsigos, C. (2008). Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones*, 7 (4), 287-293.

Lars-Gosta, D., Hard, E., & Larsson, K. (1978). Influence of Maternal Stress on the Development of the Fetal Genital System. *Physiology & Behavior*, 20 (2), pp. 193-195.

Liang, B., Wei, D. L., Cheng, Y. N., Yuan, H. J., Lin, J., Cui, X. Z., Luo, M. J., & Tan, J. H. (2013). Restraint Stress Impairs Oocyte Developmental Potential in Mice: Role of CRH Induced Apoptosis of Ovarian Cells. *Biology of Reproduction*, 89 (3), pp. 1-12.

Limpus, C. J., Baker, V., & Miller, J. D. (1979). Movement induced mortality of loggerhead eggs. *Herpetologica*, 35 (4), pp. 335-338.

Luo, Y., Hartford, S. A., Zeng, R., Southard, T. L., Shima, N., & Schimenti, J. C. (2014). Hypersensitivity of primordial germ cells to compromised replication-associated DNA repair involves ATM-p53-p21 signaling. *PLoS genetics*, 10 (7), pp. 1-11.

Manzo, C., Zerani, M., Gobbetti, A., Di Fiore, M. M., & Angelini, F. (1994). Is corticosterone involved in the reproductive processes of the male lizard. *Podarcis siculata siculata*. *Hormones and Behavior*, 28 (2), pp. 117-129.

Marcovaldi M. A., & Laurent A. (1996). A six season study of marine turtle nesting at Praia do Forte, Bahia, Brazil, with implications for conservation and management. *Chelonian Conservation and Biology*, 2 (1), pp. 55-59.

Márquez, R. (1990). FAO Species Catalogue, vol. II. Sea turtles of the world. *FAO Fisheries Synopsis*, 125.

Márquez, R. 1996. *Las tortugas y nuestro tiempo*. Ed. Fondo de Cultura Económica. México. p 197.

Matteri, R. L., Carroll, J. A., & Dyer, C. J. (2000). Neuroendocrine Responses to stress. *The biology of animal stress*, pp. 43-63.

Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A. (2010). Gonadal morphogenesis and gene expression in reptiles with temperature-dependent sex determination. *Sexual Development*, 4 (1-2), pp. 50-61.

Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., & Buehr, M. (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *International Journal of Developmental Biology*, 37 (3), pp. 407-415.

Merchant-Larios, H., Villalpando, I., & Centeno, B. (1989). Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs*, 3, pp. 43-61.

Moore, I. T., & Mason, R. T. (2001). Behavioral and hormonal responses to corticosterone in the male red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. *Physiology & Behavior*, 72 (5), pp. 669-674.

Moore, I. T., Greene, M. J., Lerner, D. T., Asher, C. E., Krohmer, R. W., Hess, D. L., Whittier, J., & Mason, R. T. (2005). Physiological evidence for reproductive suppression in the introduced population of brown tree snakes (*Boiga irregularis*) on Guam. *Biological Conservation*, 121 (1), pp. 91-98.

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), pp. 705-710.

Morreale, S. J., Ruiz, G. J., Spotila J. R., & Standora, E. A. (1982). Temperature-dependent sex determination: current practices threaten conservation of sea turtles. *Science*, 216 (4551), pp. 1245-1247.

Mrosousky, N., & Yntema, C. L. (1980). Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: Implications for conservation practices. *Biological Conservation*, 18 (4), pp. 271-280.

Mrosovsky, N. (2008). Against oversimplifying the issues on relocating turtle eggs. *Environmental management*, 41 (4), pp. 465-467.

Özdemîr, B., & Türkozan, O. (2006). Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in Northern Cyprus. *Turkish Journal of Zoology*, 30, pp. 141-146.

Phillot, A. D., & Parmenter, C. J. (2012). Anti-fungal properties of sea turtle cloacal mucus and egg albumen. *Marine Turtle Newsletter*, 134, pp. 17-21.

Pieau, C., & Dorizzi, M. (2004). Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *Journal of Endocrinology*, 181 (3), pp. 367-377.

Pieau, C., Dorizzi, M., & Richard-Mercier, N. (1999). Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55 (6-7), pp. 887-900.

Pintus, K. J., Godley, B. J., McGowan, A., & Broderick, A. C. (2009). Impact of clutch relocation on green turtle offspring. *Journal of Wildlife Management*, 73 (7), pp. 1151-1157.

Reece, S. E., Broderick, A. C., Godley, B., & 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, pp. 737-748.

Rivier, C., & Rivest, S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biology of reproduction*, 45 (4), pp. 523-532.

Rodríguez, N., Mayer, N., & Gauna, H. F. (2007). Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity. *Biocell*, 31(1), pp. 67-74.

Shaha, C., Tripathi, R., & Prasad, D. (2010). Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 365 (1546), pp. 1501-1515.

Son, G. H., Chung, S., & Kim, K. (2011). The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Frontiers in neuroendocrinology*, 32 (4), pp. 451-465.

Tokarz, R. R., (1987). Effects of the antiandrogens cyproterone acetate and flutamide on male reproductive behavior in a lizard (*Anolis sagrei*). *Hormones and Behavior*, 21 (1), pp. 1-16.

Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53 (4), pp. 865-871.

Tuttle, J., & Rostal, D. (2010). Effects of nest relocation on nest temperature and embryonic development of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Chelonian Conservation and Biology*, 9 (1), pp. 1-7.

Van de Merwe, J., Ibrahim K, I., Irvebrant, M., & Whittier, J. (2002). Effects of hatchery nest density on the emergence success and quality of *Chelonia mydas* hatchlings. *Proceedings of the 3rd workshop on SEASTAR2000*, pp. 115-119.

- 1) Van de Merwe, J., Ibrahim, K., & Whittier, J. (2005). Effects of hatchery shading and nest depth on the development and quality of *Chelonia mydas* hatchlings: implications for hatchery management in Peninsular, Malaysia. *Australian Journal of Zoology*, 53 (3), pp. 205-211.

Viau, V. (2002). Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and adrenal axes. *Journal of Neuroendocrinology*, 14 (6), pp. 506-513.

Whirledge, S., & Cidlowski, J. A. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinol*, 35 (2), pp. 109-125.

Whirledge, S., & Cidlowski, J. A. (2013). A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 154 (12), pp. 4450-4468.

Yajurvedi, H. N., & Menon, S. (2005). Influence of stress on gonadotrophin induced testicular recrudescence in the lizard *Mabuya carinata*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 303A (7), pp. 534-540.

Yajurvedi, H. N., & Nijagal, B. S. (2000). Corticosterone inhibits normal and FSH-induced testicular recrudescence in the lizard, *Mabuya carinata*. *General and Comparative Endocrinology*, 120 (3), pp. 283-288.

Yuan, H. J., Han, X., He, N., Wang, G. L., Gong, S., Lin, J., Gao, M., & Tan, J. H. (2016). Glucocorticoids impair oocyte developmental potential by triggering apoptosis of ovarian cells via activating the Fas system. *Scientific Reports*, 6 (24036), pp. 1-12.