



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales

**Efecto del estrés crónico embrionario en juveniles de la tortuga marina
*L. olivacea***

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA INTEGRATIVA**

PRESENTA:

Biól. Fany Edith Bucio Piña

Director de tesis:

Dra. Alma Lilia Fuentes Farías

Co-asesora:

Dra. Esperanza Meléndez Herrera

Morelia, Michoacán, Agosto 2018.



Agradecimientos

Primero que nada quiero agradecer a mis Padres Rafael Manuel Bucio Rodríguez y Eustolia Piña Duran por brindarme la oportunidad de venir a este mundo, guiándome en todo momento, por nunca dudar y confiar siempre en mí. También les agradezco el amor y cariño que me han dado, además el tiempo que han invertido en mi educación.

De igual forma a mis hermanos Manuel y Gamaliel quienes han sido mis mejores compañeros desde que nací, brindándome siempre su cariño.

A mis sobrinos Andrey y Alexia.

A Carlos quien ha sido mi mejor amigo, cómplice y consejero.

También quiero agradecer a mis amigos que siempre estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos, además de que aprendí mucho de cada uno.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todos los apoyos económicos otorgados que me permitieron estudiar un Posgrado.

A mi asesora la Dra. Alma, quien sin conocerme confió en mí y me compartió uno de sus proyectos para concretar mis estudios de maestría, además del tiempo que dedico para concluir mi trabajo de investigación.

A todos los profesores que compartieron sus conocimientos y experiencias durante mis estudios de posgrado.

ÍNDICE

	pág.
1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	4
4. Antecedentes	6
4.1. Clasificación de las tortugas marinas	6
4.2. Características morfológicas de <i>Lepidochelys olivacea</i>	6
4.3. Amenazas y conservación de <i>Lepidochelys olivacea</i>	7
4.4. Importancia ecológica de <i>Lepidochelys olivacea</i>	7
4.5. Estrés y activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA)	8
4.6. Control central del eje HPA de mamíferos	10
4.6.1. Hipocampo	10
4.6.2. Corteza dorso-medial de réptiles	10
4.7. Exposición crónica a estrés y sus efectos sobre el sistema nervioso	12
4.8. Efectos permanentes de la exposición perinatal sobre las capacidades reproductivas	13
4.9. Efectos del estrés crónico embrionario en <i>L. olivacea</i> emergidas de NH	15
5. Hipótesis	18
6. Objetivos	19
6.1. Objetivo General	19
6.2. Objetivos Particulares	19
7. Metodología	20
7.1. Obtención de organismos	20
7.2. Grupos Experimentales	22
7.3. Obtención de sangre y procesamiento de los órganos	24
7.4. Análisis estadísticos de los datos	25
8. Resultados	27
8.1 Medidas macroscópicas de los organismos 2013	27
8.2. Medidas macroscópicas de los organismos 2017	28
8.2.1 Peso corporal	28
8.2.2 Longitudes corporales	29
8.3. Niveles de Corticosterona en suero de pequeños juveniles	30
8.4. Análisis muestreo 2017	32
9. Inmunohistoquímica para ACTH en hipófisis	34
10. Neuronas de la corteza dorsal y dorsomedial	35
11. Análisis de las Células inter-renales	36
12. Análisis gonadal	37
13. Discusión	38
14. Conclusión	43
15. Bibliografía	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática del eje HPA en mamíferos.	9
Figura 2. Representación esquemática que muestra la organización trilaminar de la corteza de la tortuga y los principales tipos neuronales presentes.	11
Figura.3. Las crías de nidos hechos por el hombre fueron expuestas al estrés prenatal crónico.	15
Figura. 4. Las neuronas piramidales localizadas en la corteza dorsal eran hipotróficas en crías de nidos artificiales.	16
Figura.5. Las crías de nidos artificiales muestran testículos hipotróficos.	17
Figura 6. Peso corporal de los pequeños juveniles de NH y NN después de la inmovilización 2013.	27
Figura 7. Gráfico que muestra los pesos corporal de los huevos, fetos 38 días de incubación (ddi), crías emergentes, pequeños juveniles de 11 y 12 semanas de edad inmovilizados (spe [i]), de nidos naturales (NN) y nidos hechos por el hombre (NH).	28
Figura 8. Gráfico que muestra las longitudes corporales de fetos 38 días de incubación (ddi), crías emergentes, pequeños juveniles de 12 semanas de edad inmovilizados (spe [i]), de nidos naturales (NN) y nidos hechos por el hombre (NH).	29
Figura 9. Niveles séricos de corticosterona basales y post inmovilización en pequeños juveniles [NNi, NHi] (5 meses de edad) de nidos naturales (NN) y hechos por el hombre (NH) de <i>Lepidochelys olivacea</i>	31
Figura 10. Gráfico que muestra los niveles séricos de corticosterona en organismos de 38 días de incubación y emergencia de NN y NH.	32
Figura 11. Niveles séricos de corticosterona en organismos controles de NN Y NH y sometidos a reto de inmovilización de NN y NH.	33
Figura.12. Fotomicrografía que ilustran la inmunoreactividad a ACTH en la hipófisis de tortuga marina.	34
Figura 13. Neuronas piramidales de la corteza dorsal y dorsomedial de juveniles de 5 meses de edad de nidos hechos por el hombre inmovilizado (NH _i) y de nidos naturales inmovilizados (NN _i).	35
Figura 14. Las tortugas incubadas en nidos hechos por el hombre (NH) presentan una menor densidad de las células productoras de glucocorticoides que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN) en las glándulas inter-renales.	36
Figura 15. Las tortugas incubadas en nidos hechos por el hombre (NH) presentan una hipotrofia en las células germinales de las tortugas incubadas en nidos naturales (NN) en los glándulas gonadales masculinas.	37

1. Resumen

Las especies de tortugas marinas están catalogadas bajo el estado de "amenaza". Debido a esto, durante varias décadas, la principal estrategia de conservación implementada ha sido la reubicación e incubación de huevos en nidos hechos por el hombre en áreas protegidas de las playas, conocidas como viveros. En dichas estrategias, sin embargo, han sido observados bajas tasas de eclosión y emergencias, desbalances en la proporción de sexos, diferentes ambientes incubatorios así como, la presencia de hongos y bacterias en huevos de tortugas marinas expuestos a los sustratos reutilizados en varias ocasiones de los NH. Dado lo anterior, una posibilidad es que el ambiente de incubación en NH pudiera exponer al embrión/feto de manera crónica al estrés. Evidencias recientes indicaron que lo anterior realmente sucede en crías de la especie de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* emergidas en estas condiciones. En los mamíferos, abundante literatura reporta que la exposición crónica al estrés en etapas tempranas de vida, genera respuestas inadecuadas ante estímulos estresantes a mediano y largo plazo, las cuales tienen consecuencias en la salud de los individuos. No existen evidencias sobre los efectos a mediano y largo plazo de la exposición crónica al estrés incubatorio asociado con medidas de conservación en juveniles de tortugas marinas. Por lo tanto, en este trabajo probamos la hipótesis de que la exposición crónica al estrés de los embriones/fetos de *L. olivacea* asociada a la incubación en nidos hechos por el hombre se mantiene después de varios meses de vida. Para lo cual, una vez que crías emergidas de nidos hechos por el hombre y nidos naturales cumplieron cinco meses de edad, estos fueron inmovilizados de las aletas durante una semana una hora diaria y se obtuvieron muestras de suero, cerebro, hipófisis, interrenales y gónadas a modo de evaluar la morfofisiología de las respuestas crónicas al estrés. Los resultados indicaron que las tortugas inmovilizadas de cinco meses de NH mostraron un aumento significativo en los niveles séricos de corticosterona en respuesta al estímulo en comparación con los nidos naturales inmovilizadas. Además, fue observada una mayor inmunoreactividad a la hormona adrenocorticotropa hipofisiaria, así como la hipertrofia de las células productoras de glucocorticoides en las glándulas inter-renales. Así como una menor densidad de células germinales de los testículos. Finalmente, las evaluaciones histológicas de las áreas cerebrales relacionadas con la memoria espacial (corteza dorso-medial, área homóloga al hipocampo de mamíferos), mostraron neuronas piramidales con un menor número de intersecciones dendríticas. Los resultados replican lo reportado en crías recién nacidas de nidos hechos por el hombre, mostrando así, que los efectos del estrés

crónico embrionario asociados a la incubación en nidos hechos por el hombre se mantienen en el tiempo. En su conjunto estos resultados sugieren que la práctica de conservación tal y como se realiza en la actualidad, tiene un impacto negativo en la salud de las tortugas marinas a mediano plazo por lo que de manera semejantes a los mamíferos estos efectos podrían perdurar durante la vida adulta.

Palabras clave: Neuronas hipotróficas, hipoplasia testicular, Anovas anidadas, Lázaro cárdenas, Michoacán.

2. Abstract

The species of marine turtles are cataloged under the state of "threat". Due to this, for several decades, the main conservation strategy implemented has been the relocation and incubation of eggs in nests made by man in protected areas of the beaches, known as nurseries. In these strategies, however, low hatching and emergence rates have been observed, imbalances in the sex ratio, different incubation environments as well as the presence of fungi and bacteria in eggs of sea turtles exposed to substrates reused on several occasions. the NH, among other aspects. Given the above, one possibility is that the incubation environment in NH could chronically expose the embryo / fetus to stress. Recent evidence indicated that the above actually happens in offspring of the marine turtle species *Lepidochelys olivacea* emerged under these conditions. In mammals, abundant literature reports that chronic exposure to stress in early stages of life, generates inadequate responses to stressful medium and long term stimuli, which have consequences on the health of individuals. There is no evidence on the medium and long-term effects of chronic exposure to incubatory stress associated with conservation measures in juvenile sea turtles. Therefore, in this work we tested the hypothesis that chronic stress exposure of embryos / fetuses of *L. olivacea* associated with incubation in nests made by man is maintained after several months of life. For which, once emerged emerged from man-made nests and natural nests were five months old, they were immobilized from the fins for a week an hour a day and serum, brain, pituitary, interrenal and gonadal samples were obtained to assess the morphophysiology of chronic stress responses. The results indicated that the immobilized five-month NH turtles showed a significant increase in serum corticosterone levels in response to the stimulus compared to immobilized natural nests. In addition, a greater immunoreactivity to the adrenocorticotrophic hormone pituitary was observed, as well as the hypertrophy of the glucocorticoid producing cells in the inter-renal glands. As well as a lower density of germ cells of the testicles. Finally, histological evaluations of the brain areas related to spatial memory (dorsal-medial cortex, area homologous to the hippocampus of mammals), showed pyramidal neurons with a lower number of dendritic intersections. The results replicate what was reported in newborn offspring of nests made by man, showing that the effects of chronic embryonic stress associated with incubation in nests made by man are maintained over time. As a whole, these results suggest that the conservation practice as it is currently done, has a negative impact on the health of marine turtles in the medium term so that similarly to mammals these effects could last during life adult.

3. Introducción

Las especies de tortugas marinas se encuentran catalogadas bajo el status de “amenaza” (IUCN 2017; Norma (NOM) 059-SEMARNAT 2010). Ante esto, varias estrategias de "conservación" se han implementado a lo largo de varias décadas, con el objetivo de revertir esta tendencia negativa en las poblaciones (Eckert *et al.*, 1999). A nivel mundial, la estrategia implementada en mayor medida, ha sido la reubicación e incubación de los huevos en nidos hechos por el hombre (NH), maniobras que implican el expolio, el traslado y re-entierro de los huevos en áreas protegidas conocidas como viveros, dentro de los campamentos de protección de tortuga marina.

No obstante, a pesar de que estas medidas constituyen acciones prometedoras para la “conservación”, se han observado efectos adversos tales como, malformaciones, disminución en el éxito de eclosión, alteraciones en la proporción sexual, vulnerabilidad a infecciones por bacterias, hongos e insectos, así como una mayor compactación de la arena por el manejo que requiere el vivero, provocando reducción en la disponibilidad de oxígeno y estrés mecánico en los embriones (Morreale *et al.* 1982; Eckert y Eckert 1990; Marcovaldi y Laurent 1996; Reece *et al.* 2002; Chacón *et al.* 2007; Mrosovsky 2008; Phillot y Parmenter 2012). Esto sugiere que los embriones incubados en NH están sometidos de manera crónica al estrés.

En el Laboratorio de Eco-Fisiología Animal del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA) de la Universidad Michoacana se ha evidenciado que las crías tan pronto como emergen de NH, muestran niveles séricos de corticosterona muy por arriba de los que muestran las crías que emergen de nidos hechos por las hembras anidantes e incubados de forma natural (NN). En correspondencia con lo anterior, datos morfométricos mostraron hipertrofia de los núcleos de las células productoras de glucocorticoides en las glándulas inter-renales. En adición, las evaluaciones histológicas de las áreas cerebrales relacionadas a la memoria espacial y búsqueda de alimento tales como la corteza dorso-medial (CDM, área homóloga al hipocampo de mamíferos), muestran neuronas piramidales con una menor área y complejidad en su árbol dendrítico. Finalmente, el estudio del tejido gonadal sugiere que los cordones seminíferos de los testículos muestran hipoplasia, es decir, menor número de células epiteliales. Estas evidencias en conjunto sugieren que los embriones de tortuga fueron expuestos de manera crónica al estrés durante el desarrollo embrionario/fetal asociada a la incubación en NH, lo cual generó un costo negativo en la morfología

funcional de los diversos órganos del sistema neuroendocrino que media las respuestas al estrés (Herrera-Vargas *et al.* 2017).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar si los efectos en la programación del eje HPI observados en crías de *L. olivacea* a la emergencia por Herrera-Vargas *et al.* (2017), persisten en estadios juveniles (longitud del caparazón de 11 a 46 cm; de acuerdo a la definición de López-Souza, 2005), tal y como se ha reportado que sucede en mamíferos (Boonstra 2004; Lajud *et al.* 2012; Vázquez *et al.* 2013), o si estos son compensados. Para abordar lo anterior, se evaluó la respuesta a retos de estrés por inmovilización en los juveniles de cinco meses de edad, emergidos de NH y NN a través de la medición de niveles séricos de corticosterona en suero antes y después del tratamiento, las características métricas de los núcleos de los corticotrópos de la glándula hipófisis, la citoarquitectura de las células productoras de glucocorticoides de las glándulas interrenales, la citoarquitectura de las células piramidales de las cortezas dorsal y dorso-medial y la histo-diferenciación de las células germinales primarias y secundarias testiculares.

El presente trabajo pretende aportar información sobre el desarrollo postnatal de los organismos que fueron incubados en NH, y con la información, soportar los criterios para el replanteamiento de las estrategias de “protección”, no sólo de *Lepidochelys olivacea*, sino de todas las especies de tortugas marinas.

4. Antecedentes

4.1. Clasificación de las tortugas marinas

En la actualidad existen siete especies de tortugas marinas, las cuales se subdividen en dos familias:

a) La familia **Dermochelyidae** está representada por la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*), especie más grande del mundo que puede llegar a medir hasta 2.4 metros de longitud y 500 kg de peso corporal; su caparazón no presenta placas.

b) La familia **Cheloniidae** está conformada por seis especies de tortuga: verde (*Chelonia mydas*), carey (*Eretmochelys imbricata*), lora (*Lepidochelys kempii*), cabezona o caguama (*Caretta carreta*), golfina (*Lepidochelys olivacea*) y la franca oriental o Kikila Australiana (*Natator depressus*); esta familia presenta un caparazón con escudos. (Secretaría CIT, 2004).

4.2. Características morfológicas de *Lepidochelys olivacea*

La Tortuga golfina es la más pequeña de las tortugas marinas, con un peso menor a 50 kilogramos en adultos. Diferenciadas de las demás por tener una cabeza grande, ligeramente triangular; de 10 a 13 cm de ancho y con dos pares de escamas prefrontales y un pico córneo (Pritchard 2000; Varo-Cruz *et al.* 2015); su caparazón es casi circular con una anchura cercana al 90% de su longitud. Generalmente el carapacho tiene más de 15 escudos mayores, cinco dorsales y frecuentemente más de cinco pares laterales, aunque también puede presentar desigualdad en el número de escudos de ambos lados; el par lateral anterior está en contacto con el escudo precentral. El plastrón tiene cuatro escudos inframarginales y cada uno presenta un poro. Las aletas anteriores presentan una o dos uñas visibles en el borde anterior y algunas veces una pequeña uña en la parte distal. Cada aleta posterior también presenta dos uñas. El color de los adultos es verde olivo dorsalmente y blanco amarillento en el plastrón. Las crías son completamente negras cuando están mojadas, y aproximadamente a los 10 meses el plastrón es casi completamente blanco (Eckert y Eckert 1999).

Lepidochelys olivacea se distribuye en el Océano Pacífico Oriental desde el norte de California y el Golfo de California hasta Chile, con áreas de concentración en México (Baja California, sur de Sinaloa, Michoacán, Guerrero y Oaxaca), Centroamérica y más al sur, hasta la zona entre Panamá y Colombia (Márquez-Millán 1996, López- Correa 2010).

4.3. Amenazas y conservación de *Lepidochelys olivacea*

Las tortugas golfinas están expuestas a varias amenazas, como la degradación y transformación de su hábitat, la explotación de huevos, la depredación (por hormigas, cangrejos, mapaches, zorros, cuervos, buitres y gatos, gallina y perros), después de la emergencia del nido, las tortugas enfrentan otros más, como la depredación por aves. Una vez dentro del mar por peces y tiburones (Buitrago 2003), la captura directa de adultos, la captura incidental en las pesquerías, el calentamiento global y la contaminación marina. (Varo-Cruz *et al.* 2015)

La sobre explotación de las tortugas marinas y el saqueo de los huevos durante la anidación y arribadas, así como el consumo de su carne son factores que se reportan como causales del declive de sus poblaciones (Abella 2010). Debido a estos factores, se han desarrollado estrategias de conservación que incluyen la creación de viveros a donde son reubicados e incubados los nidos que se encuentren en riesgo (Parmenter 1980).

4.4. Importancia ecológica de *Lepidochelys olivacea*

Esta especie juega un papel muy importante en la red trófica, debido a que presenta la mayor tasa poblacional en comparación al resto de las especies de tortugas marinas. Al reducirse significativamente el número poblacional, podría producirse un aumento explosivo de las especies que constituyen su alimento (su dieta es omnívora con tendencia a carnívora, e incluye salpas, peces, moluscos, crustáceos, algas, briozoarios, sipuncúlidos, ascidias, huevos y peces, Montenegro *et al.* 1984). Aunado, durante las anidaciones masivas resultan beneficiadas muchas especies que habitan la playa, puesto que durante las anidaciones como en los periodos de eclosión y emergencias masivas de crías, representan una fuente de alimento para cangrejos, aves, pequeños mamíferos, etc.,

contribuyendo a regular la dinámica poblacional de otras especies tanto en su papel de depredador como en el de presa (Buitrago 2003).

4.5. Estrés y activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA)

Kyrou y Tsigo en el 2008 definen el estrés como un estado que amenaza la homeostasis del organismo, el cual es contrarrestado por un repertorio de respuestas fisiológicas que colectivamente tienen el propósito de restablecer el equilibrio perturbado (respuestas al estrés). Las respuestas al estrés son facilitadas por un conjunto de estructuras del sistema nervioso y órganos blancos.

Existen dos tipos de exposición al estrés: aguda y crónica. Una exposición aguda al estrés puede ser transitorio, es decir que puede durar minutos u horas permitiendo que el equilibrio fisiológico vuelva al organismo. Se ha probado, que su efecto es benéfico ya que permite una adaptación a las demandas del organismo, mostrando un aumento de la densidad de espinas de las neuronas piramidales de la región CA1 (Shors *et al.* 2001).

Una exposición crónica al estrés puede durar muchas horas, días, semanas o meses y la situación persiste en el tiempo de manera intensa y prolongada de modo que el organismo es incapaz de controlar y recobrar el equilibrio fisiológico en un tiempo adecuado. Esta exposición al estrés provoca una reducción de la densidad de las espinas en el hipocampo, en la corteza pre frontal medial y en las neuronas estelares espinosas del amígdala medial (Bennur *et al.*, 2007).

Una de las respuestas al estrés bien conocida es la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) en mamíferos y eje hipotalámico-pituitario-interrenal (HPI) en el caso de réptiles. Cuando un organismo está sometido a estrés, la respuesta de activación de dicho eje comienza con un incremento en la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, la cual es secretada hacia el sistema portal hipofisario estimulando a la adenohipófisis a secretar la hormona adrenocorticotropica (ACTH). La ACTH estimula la corteza adrenal en mamíferos e inter-renal en réptiles para secretar glucocorticoides (Fig. 1). El principal glucocorticoide en humanos, mamíferos y peces es cortisol (Matteri *et al.* 2000), mientras que para el caso de los anfibios, aves, roedores y réptiles es corticosterona (Stratakis y Chrousos 1995; Romero 2004). No obstante, estas respuestas deben ser transitorias. Por lo tanto, los glucocorticoides

proporcionan una retroalimentación negativa al eje HPA, por medio de la activación de receptores en el PVN, el hipocampo y la amígdala (Brunson *et al.* 2003).

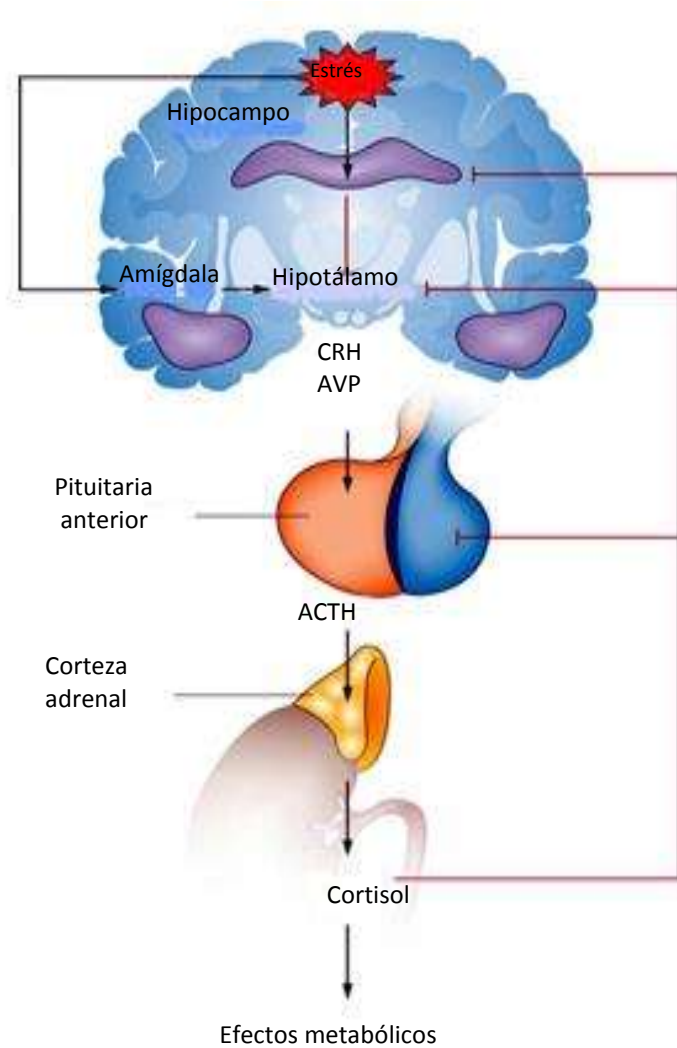


Figura 1. Representación esquemática del eje HPA en mamíferos. (Modificado de Matterri *et al.* 2000).

4.6. Control central del eje HPA de mamíferos

4.6.1. Hipocampo

El hipocampo, es una estructura cerebral involucrada en codificar, almacenar y recuperar la información que tiene que ver con la memoria y el procesamiento de las emociones, y juega un papel importante en la retroalimentación negativa en el eje HPA (Fedulov *et al.* 2007). En la retroalimentación negativa los glucocorticoides (GC) están respaldados por la expresión de receptores a glucocorticoides (GR) en el hipocampo, ya que se requiere de estos últimos para la inhibición del eje (Myers *et al.* 2012, Tsigo *et al.* 2016).

Esta región cerebral es importante para el funcionamiento del eje HPA, estimulando negativamente sus niveles superiores inhibiendo así su activación (Herman *et al.* 2005). El hipocampo expresa los niveles más elevados de receptores a glucocorticoides (GR) y receptores a mineralocorticoides (MR) que cualquier otra parte del cerebro, sugiriendo un alto nivel de receptividad para la hormona (Fuxe *et al.* 1985, Arriza *et al.* 1998, Myers *et al.* 2012). La producción del hipocampo es en gran parte glutamatérgica y, por lo tanto, excitatoria. Por consiguiente se piensa que la inhibición está mediada por la activación de las neuronas GABAérgicas que se proyectan hacia el núcleo paraventricular (PVN) en la región del núcleo de la cama de la estría terminalis (BST), área preóptica (APO), hipotálamo dorsomedial (DMH) y peri-núcleo paraventricular (peri-PVN) (Myers *et al.* 2012).

La exposición crónica a dosis farmacológicas de corticosterona o a diversos tipos de exposición crónica al estrés (social, retención, separación maternal, etc.) se asocian con la remodelación de las neuronas del hipocampo (Margariños *et al.* 1996; Vyas *et al.* 2002).

4.6.2. Corteza dorso-medial de réptiles

En el caso de réptiles la región corteza dorsomedial (CDM) es considerada como una estructura homóloga a las regiones CA2 y CA3 del hipocampo de los mamíferos debido a su citología, patrones de respuestas corticales, las proyecciones de conexiones con otras áreas (Ulinsky 1990) y a su ontogénesis tardía (Ariens 1929).

La región corteza dorso-medial contiene dos tipos de neuronas, las neuronas piramidales y las neuronas estelares (fig. 2) (Ulinsky 1990). Las neuronas piramidales se encuentran ubicadas en la capa celular y pueden tener de una a varias dendritas apicales espinosas que se extienden verticalmente dentro de la capa molecular y hasta la pía, contienen diversas dendritas basales dirigidas a la capa subcelular a través del borde endepidial. Las dendritas están cubiertas de espinas, tienen un soma mediano de forma fusiforme a oval, comúnmente presenta axones orientado verticalmente, que se extiende de manera descendente hacia la capa cortical adyacente. (Ariens *et al.* 1936; Ulinsky 1990).

Las neuronas estelares están situadas en la capa molecular y subcelular, muestran un soma pequeño de forma oval a circular y presentan dendritas espinosas acomodadas de forma vertical. Estas exhiben sistemas axonales arborizando extensivamente dentro de la población de los campos celulares dendríticos (Ulinsky 1990; Reiner 1991).

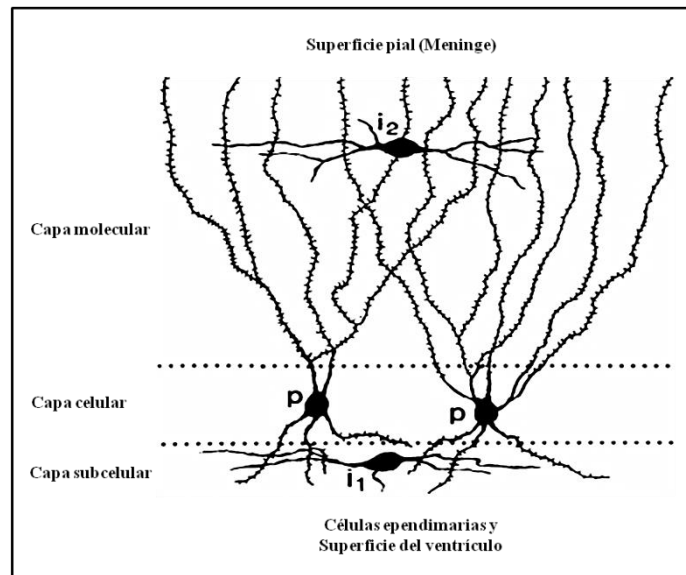


Figura 2. Representación esquemática que muestra la organización trilaminar de la corteza de la tortuga y los principales tipos neuronales presentes (Modificado de Shen y Kriegstein, 1986. Tomado de the hippocampal Cortex Contains Distinct Cell Types, Burst-Firing Neurons, and an Epileptogenic Subfield).

El patrón de las conexiones aferentes y eferentes en la región CDM en réptiles también comparte características con el hipocampo de los mamíferos (Northcutt 1981; Ulinsky 1990).

4.7. Exposición crónica a estrés y sus efectos sobre el sistema nervioso

La sobre-estimulación a largo plazo de respuestas de afrontamiento (exposición crónica al estrés) de los circuitos implicados en la regulación de las respuestas al estrés da como resultado la acumulación de respuesta alostática en las áreas cerebrales encargadas de la retroalimentación negativa del eje HPA (Romero 2004; López 2015). Esta respuesta al estrés se localiza tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en la periferia y son determinadas por una gran variedad de factores tanto genéticos, ambientales y de desarrollo. Estas respuestas dependen de una infraestructura neuroendocrina, celular y molecular altamente interconectada al sistema de estrés (Tsigo *et al.* 2016). Los cambios en estas estructuras pueden llevar a una exacerbación de las respuestas adaptativas causadas por la exposición crónica al estrés (López 2015). La desregulación del sistema de estrés (hiper o hipoactivación) en asociación con la exposición crónica puede alterar la homeostasis del cuerpo que conduce a un estado de alostasis (Tsigo *et al.* 2016). Esta sobre activación del eje del estrés incrementa los niveles basales de glucocorticoides, permitiendo el paso hacia la barrera cerebral, actuando sobre los receptores del hipocampo, área cerebral relacionada con la cognición, alterando así el desarrollo del cerebro (López 2015).

La exposición crónica al estrés durante estadios tempranos de vida, es capaz de programar al eje HPA, favoreciendo permanentemente su activación, generando una elevación exacerbada de glucocorticoides que dificulta la recuperación de la homeostasis (Richardson 2006). Por lo tanto, la exposición crónica a estrés altera significativamente la expresión genética de factores neurotróficos o factores que intervienen en el desarrollo de las células del sistema nervioso responsables de la proliferación, diferenciación y modelamiento neuronal. (Boyle 2013).

En conjunto, estos cambios generan modificaciones a largo plazo en la cito-arquitectura de los núcleos cerebrales que regulan las respuestas al estrés, como es el caso del hipocampo (Kim y Diamond 2002; Joels y Baram 2009; Maras y Baram 2012).

En aves cantoras (gorriones blancos y cotorros) y mamíferos (ardillas terrestres articas), el eje del estrés en desarrollo es particularmente vulnerable a experiencias tempranas y puede resultar en la programación de toda la vida de la respuesta al estrés y el control homeostático (Boonstra 2004), causando alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso central aumentando la vulnerabilidad a

una serie de trastornos patológicos en la edad adulta (Aisa *et al.* 2007). La plasticidad de los sistemas fisiológicos prenatales, que actúa sobre la madre y/o el feto, permite a los animales no nacidos estar preparados para enfrentar diversas condiciones ambientales (Gluckman *et al.* 2005).

Sin embargo en ratas, descendientes de madres, bajo condiciones extremas de estrés durante el embarazo, muestran anomalías fisiológicas y de comportamiento a corto y largo plazo tales como la reducción del peso al nacer, problemas de locomoción y retraso cognitivo, ansiedad y trastornos del sueño. Estos resultados se observan más tarde en la vida de los individuos, de hecho, hay evidencia que muestra que las experiencias ambientales adversas a principio de su vida predisponen a los individuos al desarrollo afectivo y trastornos de ansiedad en la edad adulta (Heim y Nemeroff 1999).

4.8. Efectos permanentes de la exposición perinatal sobre las capacidades reproductivas

Estudios en aves, mamíferos y réptiles han mostrado que la exposición crónica al estrés en etapas prenatales afecta el éxito del nacimiento, al igual que la anatomía y ensamble de los circuitos neuronales en diversas regiones cerebrales (Boonstra 2004; Mitra *et al.* 2005; Mandyam *et al.* 2008; Denver 2009; Morales-Medina *et al.* 2009; Boyle 2013) lo que conduce a trastornos conductuales (Kim y Yoon 1998; Stewart *et al.* 2005) y alteraciones en el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG). Por lo tanto, no es de sorprender que la exposición a estresores físicos y psicológicos alteran las capacidades sexuales y/o reproductivas, inhabilitando la secreción de gonadotropinas (Denardo y Lighr 1993; Chrousos *et al.* 1998; Osadchuk *et al.* 2000; Greenberg 2002, Mulder *et al.* 2002; Kapoor y Matthews 2008), además de favorecer a una serie de patologías metabólicas a animales adultos (Greenberg y Wingfield 1987).

Las hormonas del eje HPA tienen un efecto inhibitorio sobre el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG), de tal manera que la hormona liberadora de corticotropina elimina de forma directa e indirectamente las neuronas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) a través de la secreción de β -endorfinas por las neuronas POMC (proopiomelancortina) arqueadas. Además indican que CRH-R1 restringe los efectos del estrés agudo en el eje reproductivo en cambio la antalarmina antagonista selectivo de CRH-R1 el cual su función es de inhabilitar estos efectos. Así mismo, los glucocorticoides ejercen efectos inhibitorios sobre las neuronas GnRH y sobre las gonadotropinas pituitarias y directamente sobre las gónadas haciendo que los órganos y tejidos diana sean resistentes

a los esteroides sexuales. Por lo que, las hormonas esteroideas (esteroidogenesis) inhibe directamente a los ovarios y testículos, provocando la inhabilitación de GnRH desde el hipotálamo (Tsigo *et al.* 2016).

Una exposición prolongada al estrés, por otro lado inhibe la función reproductiva, dada la activación exacerbada del eje HPA. La intensidad de los estresores en la naturaleza podría diferir de la ejercida en los individuos de estudio en los laboratorios. En el laboratorio, se han usado diversos estresores ya sea de manera individual o usando una combinación, mientras que en los hábitats naturales son variados los estresores que impactan y determinan el éxito reproductivo de las generaciones en particular (Norris y López 2010).

El estrés tiene un impacto negativo sobre la reproducción en múltiples niveles. Es conocido que los fetos expuestos a factores estresantes como ambientes inapropiados y agentes químicos dañinos, sufren alteraciones que inhiben la actividad normal de las gónadas, las cuales a su vez, afectan el desarrollo sexual y el comportamiento en el adulto (Taché *et al.* 1980).

Así mismo, se ha reportado que una exposición prenatal al estrés en ratas macho conduce a un menor índice gonadosomático (Dahlof *et al.* 1978), y que estas diferencias persisten en estadios post-natales (Meisel *et al.*, 1979; McLeod y Brown, 1988; Rodríguez *et al.*, 2007; Kapoor y Mathews 2008).

4.9. Efectos del estrés crónico embrionario en *L. olivacea* emergidas de NH

Herrera-Vargas *et al.* (2017) mostró que a la emergencia de las crías de *L. olivacea* incubadas en NH, hubo hipertrofia de las células productoras de corticosterona por parte de las glándulas inter-renales en correspondencia con altos niveles séricos de corticosterona, datos que sugieren la sobre-activación del eje HPA (fig. 3). Este resultado, en conjunto con el incremento en los niveles circulantes de corticosterona en respuesta a un reto fisiológico agudo (la llegada al mar) presentando por las crías incubadas en NH (fig. 3 E) sugieren que las crías incubadas en NH presentaron una desregulación del eje HPI generando un costo negativo en la morfología funcional de diversos órganos del sistema neuroendocrino que media las respuesta al estrés (Herrera-Vargas *et al.* 2017).

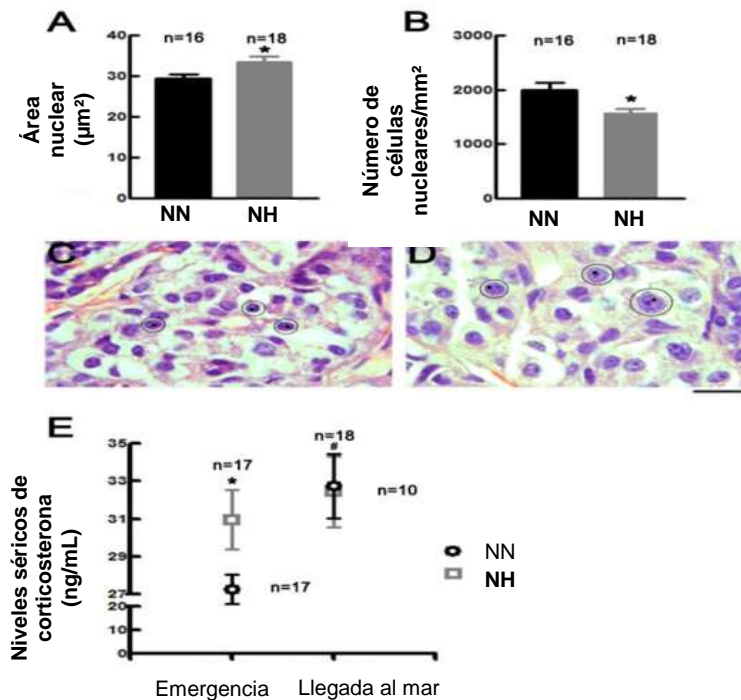


Figura 3.-Las crías de nidos hechos por el hombre fueron expuestas al estrés prenatal crónico. A) Gráficas de barras muestran el área nuclear (ANOVA anidada $F_{(1, 28)} = 7.7793$, (ANOVA anidada $F_{(1, 28)} = 7.7793$, $p = 0.00939$) y la B) Densidad nuclear (ANOVA anidada $F_{(1, 28)} = 11.142$, * $p = 0.002395$) de las células productoras de glucocorticoides en tortugas recién emergidas a partir de C) NN o D) NH. E) Gráfico de dispersión que muestra los niveles séricos de corticosterona poco después de la emergencia y al llegar a la orilla del océano (ANOVA anidada $F_{(2, 51)} = 5.5831$, $p = 0.00642$. Modificado de Herrera-Vargas *et al.* 2017).

En adición, Herrera-Vargas *et al.* (2017) mostraron que a la emergencia las crías presentaron neuronas piramidales hipotróficas de la región corteza dorsomedial (CDM, área homóloga al hipocampo de los mamíferos. Fig.4).

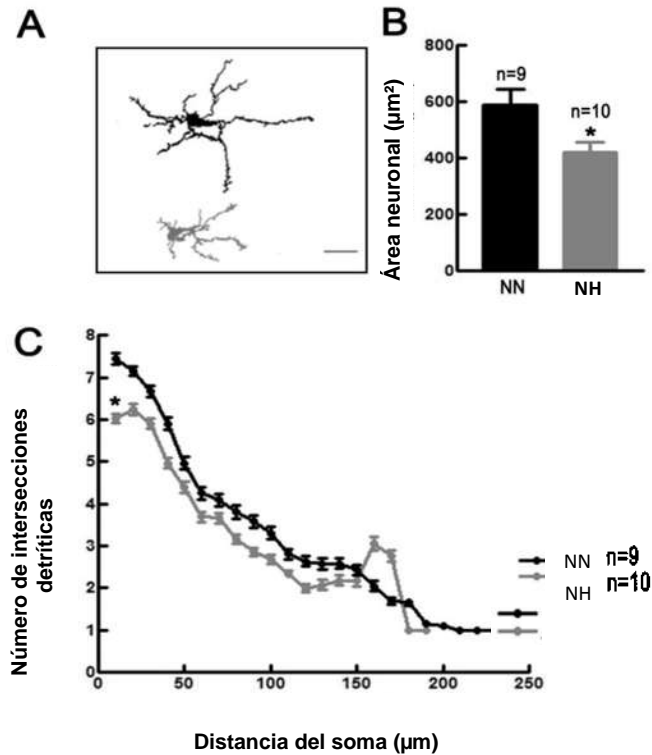


Figura. 4.- Las neuronas piramidales localizadas en la corteza dorsal eran hipotróficas en crías de nidos artificiales. A) Dibujos representativos de las neuronas piramidales localizadas en la corteza dorsal de las crías de nidos naturales y Nidos hecho por hombre. (B). Gráfico de barras que representa el área media de las neuronas en la corteza dorsal de las crías de NN y NH. (ANOVA anidado $F_{(1, 13)} = 11,9983$, $*p = 0,004195$). C) Gráfico que muestra el número promedio de intersecciones dendríticas que cruzan las matrices de círculos concéntricos de Sholl respecto a la distancia desde el centro geométrico del soma celular (ANOVA anidado $F_{(2, 17)} = 16,04$ $p < 0,05$. Modificado de Herrera-Vargas *et al.* 2017).

Finalmente también fue evidenciada la disminución del número de células epiteliales contenidas en los cordones seminíferos de los testículos sugiriendo retraso en desarrollo de estas estructuras (Fig. 5).

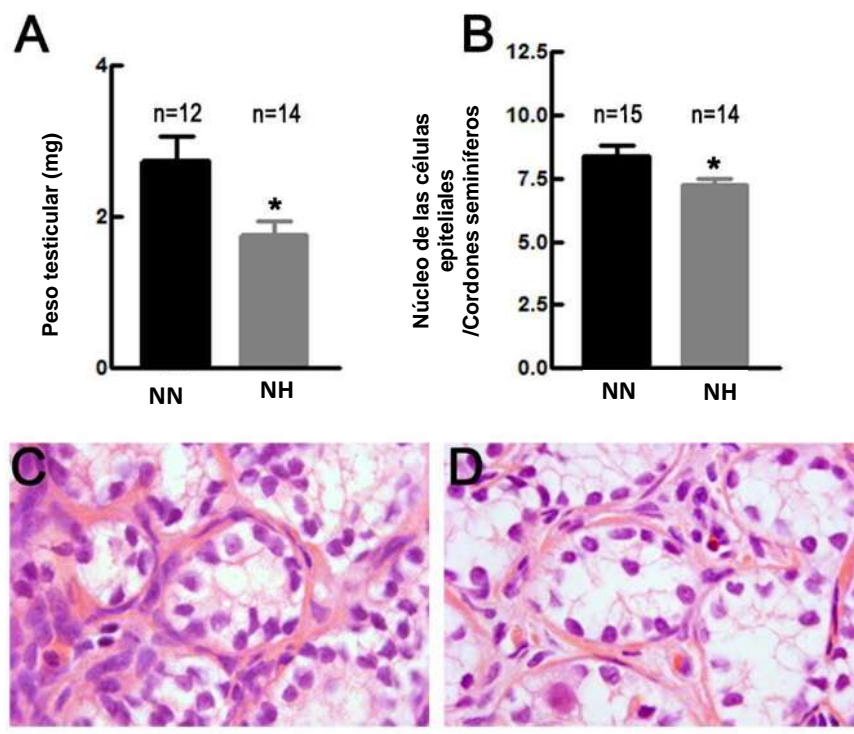


Figura.5. Las crías de nidos artificiales muestran testículos hipotróficos. A) Gráfica de barras representan el peso testicular (ANOVA anidada $F_{(1, 21)} = 8.0317$, * $p = 0.009940$) y B) La cantidad de células epiteliales por cordón seminífero (ANOVA anidado $F_{(1, 23)} = 4.8445$, * $p = 0.038445$) en tortugas recién nacidas de NN y NH. Fotomicrograffas de secciones histológicas mostrando células epiteliales en conductos seminíferos de crías de NN (C) y NH (D). (Modificado de Herrera- Vargas *et al.* 2017).

Todo lo anterior en conjunto apunta a que la incubación en NH causa una desregulación del eje HPI en crías de *L. olivacea*. Una vez revisados los antecedentes expuestos, la pregunta que este estudio pretende responder es si ¿persistirán los efectos negativos observados al nacimiento de *Lepidochelys olivacea* durante etapas tempranas de desarrollo posteriores?

5. Hipótesis

1. El eje hipotalámico-hipofisario-inter-renal (HPI) de pequeños juveniles de tortuga marina gestados en NH presenta respuestas alteradas al reto de estrés por inmovilización.

2. La cito-arquitectura de la corteza dorsal, dorso-medial y testicular permanece afectada por los efectos de la exposición crónica al estrés asociada a la incubación en NH en juveniles.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar la permanencia de los efectos impuestos durante la gestación en NH sobre las estructuras que regulan la función del eje HPI, cerebro y gónadas en pequeños juveniles de tortuga marina, usando como modelo animal a la especie *L. olivácea*.

6.2. Objetivos particulares

1. Cuantificar los niveles séricos de corticosterona de juveniles emergidos de NH y NN sin reto y en aquellos sometidos a reto de estrés por inmovilización.
2. Evaluar la inmunoreactividad de las células corticótropas secretoras de ACTH en la hipófisis de juveniles de NH y NN inmovilizados.
3. Determinar si persiste la hipotrofia de las neuronas piramidales de la corteza dorsal y dorsomedial en juveniles de NH y NN inmovilizados.
4. Evidenciar si persiste hipertrofia de las células productoras de glucocorticoides en juveniles de NH y NN inmovilizados.
5. Medir el tamaño de los núcleos de las células germinales gonádicas en juveniles de NH y NN inmovilizados.

7. Metodología

7.1. Obtención de organismos

Hubo 2 períodos de muestreo para la realización del presente trabajo. En el primero, las crías de *L. olivacea* fueron obtenidas a la emergencia de NN y NH en las playas de Barra de Pichi de Lázaro Cárdenas, Michoacán, México en el campamento tortuguero “La tortuga” en el 2013 (Permiso SEMARNAT; Oficio Núm. SGPAS/DGVS/08371/12).

Posteriormente, las crías fueron trasladadas al Laboratorio de Eco-fisiología Animal del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las crías fueron mantenidas en un sistema cerrado de recirculación compuesto por seis peceras de vidrio de 250 L de capacidad. El agua marina se mantuvo a una salinidad constante de 32 a 36 ppm y una temperatura entre los 25 y 26°C, para lo cual les fue colocado un calentador de acuario de 300 Watts a cada estanque (Aguilar, 1986; López, 2010). Adicionalmente fue colocado un temporizador de luz (Modelo TE-102) programado para encenderse a las 7 am y apagarse a las 7 p.m. En cuanto a la alimentación se utilizó alimento peletizado de la marca Wardley® Premium Turtle Bites™ Wardley® que contiene un 35% de proteína, un 3.5% de grasa y un 5% de fibra cruda recomienda por el fabricante para tortugas recién eclosionadas. A las crías se les proporcionó diariamente todo el alimento que pudieron consumir. Cuando las tortugas tenían tres meses en cultivo, el alimento se cambió por Premium Turtle Bites™. Los residuos de alimento y sus excretas fueron eliminados diariamente con un sifón de 3 cm de luz. Cada mes se lavaron los estanques con una esponja y agua dulce durante 5 meses (López, 2010).

Dado el grado de mortandad que se tuvo con la colecta 2013 de los organismos en cautiverio, se planificó una segunda, con el fin de lograr una muestra más representativa de nuestros grupos experimentales, sin embargo esta no fue posible llevarse a cabo en el campamento de Barra de Pichi pues esta temporada del 2017 no se trabajó por cuestiones de inseguridad y llegada de recursos tardía (*Com. Prsl.*). Así el muestreo fue llevado a cabo en el campamento tortuguero de Boca Seca en Octubre del 2017 (Permiso SEMARNAT; Oficio Núm. SGPA/DGVS/10395/17). Organismos de 38 días de incubación y crías recién emergidas del nido fueron tomados(as) al azar, en lapsos de 5 minutos, en un tiempo total de 25 minutos; Pesados (as) mediante el uso de una báscula romana

tubular; medidos(as) usando un Vernier digital e inmediatamente fueron decapitados (as). Las muestras de sangre fueron colectadas individualmente en microtubos y mantenidas a -75°C .

Las crías provenientes de NN y NH fueron trasladadas al Laboratorio de Eco-fisiología Animal del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA), las cuales se mantuvieron en iguales condiciones que las colectadas durante el periodo 2013.

A los dos meses y medio las 12 crías provenientes de NN y NH fueron sometidas a un estímulo o reto de estrés crónico. Fueron inmovilizadas durante una hora diaria, una semana antes de que se cumpliera las 12 semanas de vida. Posteriormente, se les sustrajo sangre del seno cervical con una jeringa de tuberculina y se dejó pasar una hora para finalmente ser sacrificadas y colectar la sangre y órganos.

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.

7.2. Grupos Experimentales

Se trabajó con los siguientes grupos experimentales:

Muestreo 2013

- **Grupo nido natural basal (NN):** Organismos de cinco meses de edad, provenientes de nidos naturales (2013, n=1: 3 crías).
- **Grupo de nido hecho por el hombre basal (NH):** Organismos de cinco meses de edad, provenientes de nidos artificiales (2013, n=1: 5 crías).
- **Grupo nido natural de cinco meses de edad (NNi):** Organismos de cinco meses de edad, provenientes de nidos naturales sometidos a reto de estrés por inmovilización (2013, n=2: 6 crías).
- **Grupo nido hecho por el hombre de cinco meses de edad (NH_i):** Organismos de cinco meses de edad, provenientes de nidos artificiales sometidos a reto de estrés por inmovilización (2013, n=1:11 crías).

Muestreo 2017

- **Crías de nido natural 38 días de incubación (NN):** (2017, n=6) = 16 crías.
- **Crías de nido hecho por el hombre 38 días de incubación (NH):** (2017, n=6) =16 crías.
- **Crías recién emergidas de nido natural (NN):** (2017, n=6) = 12 crías.
- **Crías recién emergidas de nido hecho por el hombre (NH):** (2017, n=6) = 12 crías.
- **Crías 12 semanas de edad de nidos naturales (NN control):** (2017, n=3)= 6 crías.
- **Crías 12 semanas de edad de nidos naturales (NN control después de 1 Hora):** (2017, n=3) = 6 crías.
- **Crías 12 semanas de edad de nidos Hechos por el hombre (NH control):** (2017, n=3) = 6 crías.

- **Crías 12 semanas de edad de nidos hechos por el hombre (NH control después de 1 Hora):** (2017, n=3) = 6 crías.
- **Crías 12 semanas de edad de nidos naturales sometidas a inmovilización (NNi):** (2017, n=3) = 6 crías.
- **Crías 12 semanas de edad de nidos naturales sometidas a inmovilización después de una Hora (NNi [1]):** (2017, n=3)= 6 crías.
- **Crías 12 semanas de edad de nidos hechos por el hombre sometidas a inmovilización (NHi):** (2017, n=3)= 6 crías.
- **Crías 12 semanas de edad de nidos hechos por el hombre sometidas a inmovilización después de una Hora (NHi [1]):** (2017, n=3)=6crías.

7.3. Obtención de sangre y procesamiento de los órganos

Todas las crías fueron medidas, pesadas y anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (45 mg/Kg peso), y decapitadas rápidamente para posteriormente obtener muestras de sangre vía cardíaca. Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 15 min. El suero resultante fue congelado en nitrógeno líquido y posteriormente preservado en ultracongelación a -75° C para cuantificar los niveles de corticosterona de acuerdo al método de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; 55-CORMS-E01, Alpcó). Posteriormente la toma de muestras se obtuvo alrededor de la media noche, una vez que cumplan cinco meses de edad, en los grupos NN y NH, y posterior a ser sometidas a estrés por inmovilización, una hora diaria durante una semana, los grupos NNi y NHi.

Los cerebros de cada animal fueron colectados y preservados en solución Golgi-Cox y seccionados coronalmente en criostato (Hydrax C25 Zeiss) para estudiar la citoarquitectura neuronal. Las neuronas impregnadas mediante la técnica de Golgi-Cox fueron reproducidas en cámara lúcida adaptada a un microscopio óptico DM3000, utilizando el aumento de 400x, posteriormente fueron escaneadas (en formato JPG y en escala de grises con 200 dpi de resolución; Brother) junto con una escala calibrada para el posterior análisis de imagen computarizado.

Se seleccionaron 10 neuronas piramidales con mejor grado de impregnación para la corteza dorsal y dorsomedial por cerebro. Mediante el software ImageJ (NATIONAL Institute of Health, <https://imagej.softonic.com>), se midió el número de intersecciones dentríticas y el radio dentrítico fueron analizados mediante el plugin NeuronJ del software ImageJ. El resto del organismo fue preservado en solución fijadora de paraformaldehído al 4% y posteriormente se realizó la disección de pituitarias, inter-renales y gónadas. Finalmente, las glándulas pituitarias, inter-renales y gónadas fueron incluidas en parafina y seccionadas a 5 µm en micrótomos para su posterior tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E), a excepción de las pituitarias, las cuales fueron procesadas mediante la inmunohistoquímica anti-ACTH policlonal de conejo que reconoce epitopes de rata para probarlo en las tejido de tortuga.

En cuanto a las glándulas inter-renales, fueron seleccionados al azar veinticuatro cuadrantes en cuatro secciones a lo largo de toda la estructura, y se fotografió una imagen por cuadrante a un

aumento de 1000x (Leica DM3000). Se obtuvo el número de células y área nuclear mediante el uso del software ImageJ. El número total de células divididas por el área de los cuatro cuadrantes serán considerados como la densidad celular.

Para el análisis gonadal, fueron seleccionadas al azar dos secciones de cada par, a partir de ellas se obtuvo el número total de células germinales que cumplieron con los criterios de selección (circularidad, forma oval, nucléolo). Se analizaron mediante el uso de ImageJ. Esto se realizó a partir de fotomicrografías a un aumento de 1000x. Los datos obtenidos fueron analizados de modo semejante a los datos obtenidos de las glándulas inter-renales.

7.4. Análisis estadísticos de los datos

Los datos de todas las variables obtenidas fueron analizados mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Lilliefors ($\alpha \leq 0.05$) para verificar la normalidad y homogeneidad de varianzas respectivamente. De modo que los datos normales y los que no presentaron normalidad fueron tratados mediante los modelos lineales generalizados (MLG) y no generalizados (MLNG) respectivamente. El MLNG con una distribución de Poisson y una función Log.

De manera general, para determinar la relación entre las variables y para conocer diferencias entre los subgrupos (números de nidos) estudiados se realizaron las siguientes pruebas:

Los niveles séricos de corticosterona de 2013 entre grupos (Tipos de nido), subgrupos (números de nido) y tratamientos (basales e inmovilizadas) fueron analizados mediante un ANOVA (Análisis de varianza) anidado. Posteriormente, fue realizada una comparación múltiple *post hoc* de Fisher LSD con un 95% ($\alpha \leq 0.05$) de confianza para identificar diferencias significativas.

De modo semejante fueron analizados los niveles séricos de corticosterona de 2017 entre grupos (tipos de nido), subgrupos (números de nido) y momentos (de 38 días y emergencias). Así como para los niveles séricos entre grupos (Tipos de nido), subgrupos (números de nido) y tratamiento (0 horas y 1 hora de inmovilización) a los que fueron sometidos los pequeños juveniles.

El número de intersecciones dendrítico de las neuronas piramidales entre grupos (tipos de nido), subgrupos (números de nido) y distancias desde el soma (10, 20, 30, etc.) fueron también analizados mediante un ANOVA anidado.

Para el resto de las variables obtenidos en el 2013 (morfométricos, área y densidad de células productoras de GC, así como densidad de Celulas de GC) sólo entre grupos (tipos de nido) y subgrupos (números de nido) fueron analizados de igual modo con el ANOVA anidado.

En el caso de las variables morfo métricas obtenidas hasta el momento de los organismos colectados y cultivados del 2017 fueron determinados los ANOVAS anidados entre grupos (tipos de nidos), subgrupos (números de nidos). Edades (Huevo, 38 días de incubación, emergencia, 11 semanas de edad inmovilizadas y 12 semanas de edad inmovilizadas) y tratamientos (basales e inmovilizados).

El software Statistica versión 7 fue utilizado para llevar a cabo todos los análisis. El promedios y error estándar fueron presentados para los gráficos.

8. Resultados

8.1. Medidas macroscópicas de los organismos 2013

El peso corporal de los pequeños juveniles (5 meses de edad) de *L. olivacea* del NH (142.1 ± 29.11 , $n=6$) con respecto de los NN (121.6 ± 14.23 , $n=11$) no mostraron diferencia estadísticamente significativas ($F_{(1,14)}=.13708$, $p=0.71674$) observándose sólo la tendencia a un menor peso corporal en los organismos de NH (Fig. 6).

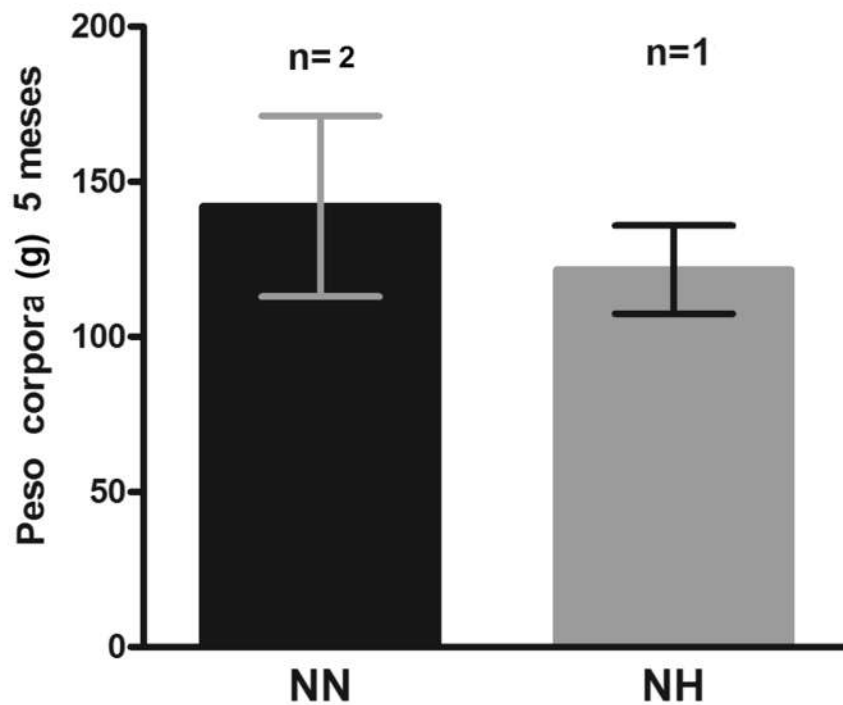


Figura 6. Peso corporal de los pequeños juveniles de NH y NN después de la inmovilización 2013 (ANOVA anidada $F_{(1,14)}=.13708$, $p=0.71674$).

8. 2. Medidas macroscópicas de los organismos 2017

8.2.1. Peso corporal

El análisis anidado de los pesos corporales entre los tipos de nido, las edades y los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas (Wald $X^2(8)=902.57$, $p=0.001$). Los pesos de los huevos de NH (34.194 ± 0.645 ; $n=6$; 30) frente a los NN (33.59 ± 1.05 , $n=6$; 30) no mostraron diferencias significativas. Sin embargo al momento de la emergencia no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los NH (15.263 ± 0.444 ; $n=6$; 30) frente a los NN (16.997 ± 0.393 ; $n=6$; 30). El desarrollo desde las crías emergentes hasta las 11 semanas mostró una elevación exponencial. Por su parte los organismos juveniles de 12 semanas inmobilizadas de NH desplegaron menores pesos corporales una semana antes de la inmobilización (11 semanas) y una vez que se implementó dicho reto (Fig. 7).

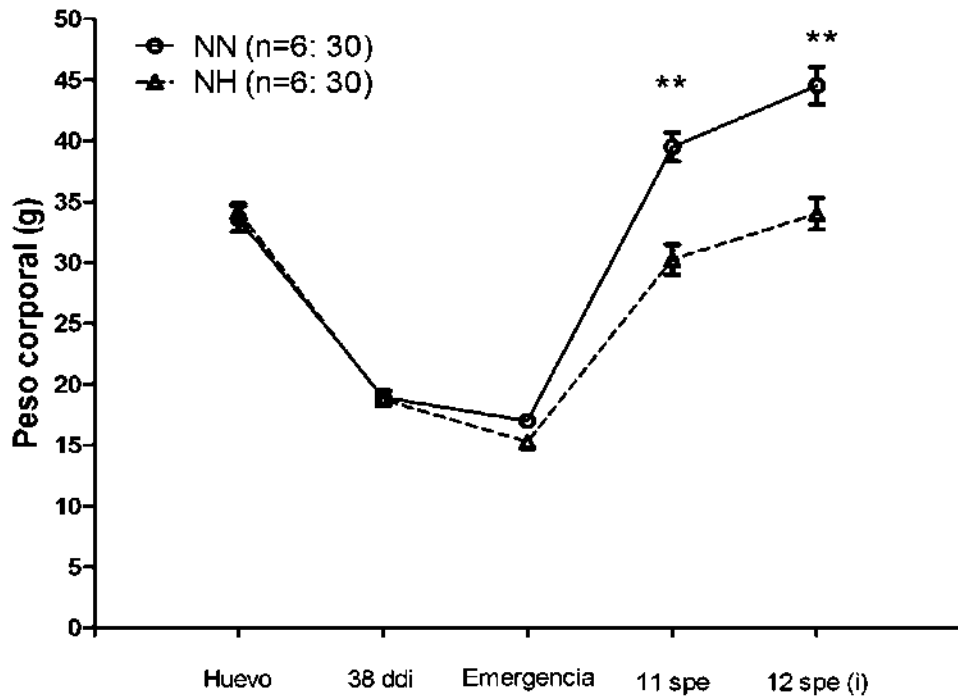


Figura 7. Gráfico que muestra los pesos corporal de los huevos, fetos 38 días de incubación (ddi), crías emergentes, pequeños juveniles de 11 y 12 semanas de edad inmobilizados (spe [i]), de nidos naturales (NN) y nidos hechos por el hombre (NH). Se presentan los promedios \pm Error estándar (ES) Números de nidos analizados (n) =6 conteniendo 30 individuos cada nido).

8.2.2. Longitudes corporales

El análisis anidado de las longitudes ocico cloaca entre los tipos de nido, las edades y los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas (Wald $X^2(4)=338.60, p=0.001$). La longitud de ocico cloaca de NH de 38 días de incubación (ddi. $57.28 \pm n=6:30$) no presentaron diferencia estadísticamente significativas frente a los 38 ddi de NN ($60.54 \pm 0.783, n=6:30$). En cambio, las crías NH emergentes ($60.90 \pm 0.69; n=6:30$) presentaron menores tallas corporales con diferencias estadísticamente significativas y esto con respecto a las NN emergentes ($65.21 \pm 0.44; n=6:30$). A su vez, fue observado un desarrollo exponencial desde cría a pequeño juvenil. Los juveniles NH inmovilizados ($82.29 \pm 1.34; n=6:30$) presentaron menores tallas con diferencias estadísticamente significativas respecto de las NN ($87.70 \pm 0.83; n=6:30$).

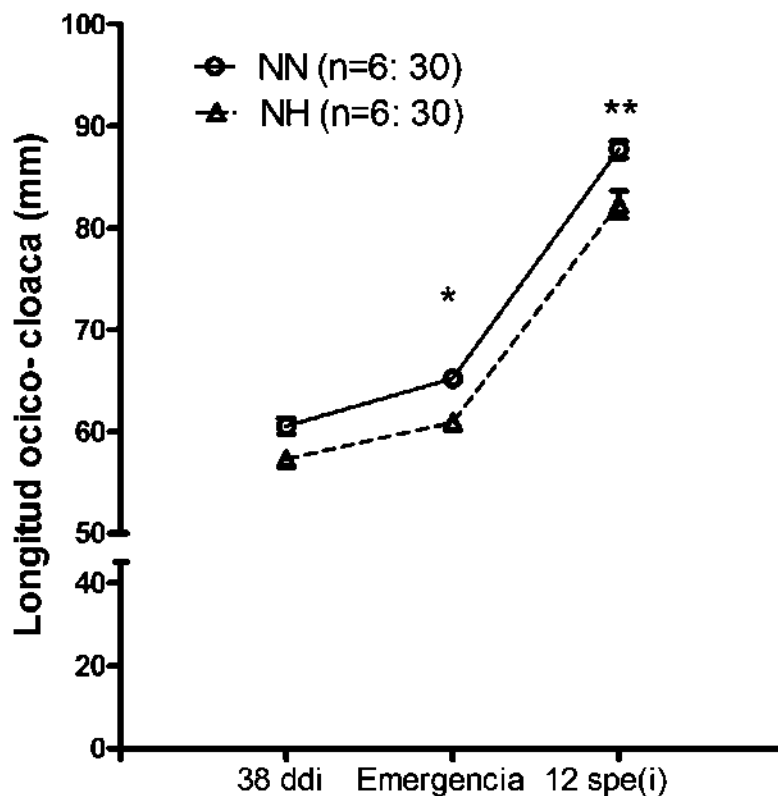


Figura 8. Gráfico que muestra las longitudes corporales de fetos 38 días de incubación (ddi), crías emergentes, pequeños juveniles de 12 semanas de edad inmovilizados (spe [i]), de nidos naturales (NN) y nidos hechos por el hombre (NH). Se presentan los promedios \pm Error estándar (ES). Números de nidos analizados (n) =6 conteniendo 30 individuos cada nido).

8.3. Niveles de Corticosterona en suero de pequeños juveniles

Los resultados obtenidos para individuos colectados en el 2013 en cuanto a niveles basales de corticosterona (sin inmovilización), mostraron sólo una tendencia a ser mayores en los juveniles nacidos en NH (42.07 ± 3.866 ; $n=11$) en comparación con los nacidos de NN (39.03 ± 2.707 ; $n=6$). (ANOVA anidada $F_{(1,21)} = 0.80455$, $p = 0.37991$). Una vez que los organismos fueron sometidos al reto de inmovilización, la diferencia se mostró significativa; siendo más elevados en los juveniles de NH (32.15 ± 1.051) comparados con los NN (25.1 ± 1.51). Fisher LSD, $*p = 0.0117$). Resultó notable que los niveles séricos de corticosterona disminuyeran en los individuos sometidos a reto por inmovilización tanto en los de NN como de NH, en comparación con los niveles medidos en tortugas que no fueron sometidas a retos, procedentes de ambos tipos de nido. Al comparar los NH basales frente a los NH inmovilizados fue observado una disminución estadísticamente significativa (Fisher LSD, $\text{¥} p = 0.0014$). A su vez, de manera semejante, los NN basales frente a los NN inmovilizados también fue observado una disminución cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas (Fisher LSD, $\text{¥} p = 0.0008$).

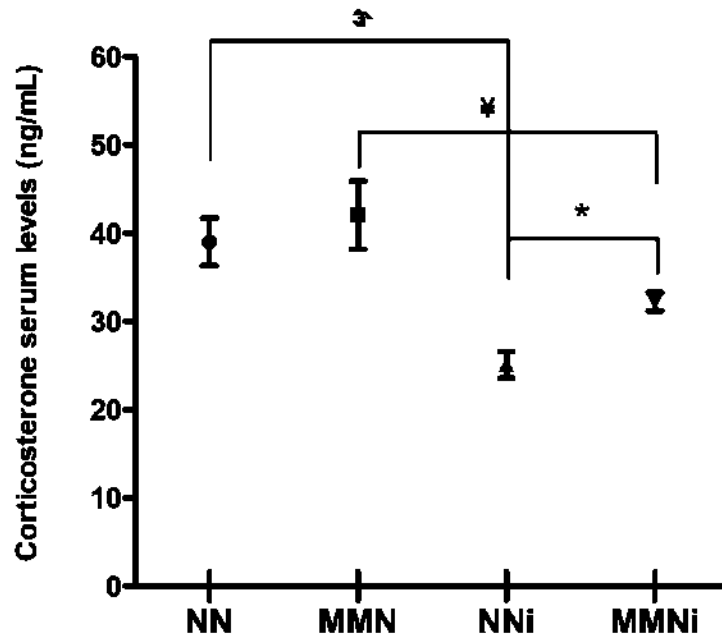


Figura 9. Niveles séricos de corticosterona basales y post inmovilización en pequeños juveniles [NNi, NHi] (5 meses de edad) de nidos naturales (NN) y hechos por el hombre (NH) de *Lepidochelys olivacea*. Se presentan los promedios \pm Error estándar (ES) Números de nidos analizados (NN. n = 2=6, NH =1=11).

8.4. Análisis muestreo 2017.

Se evaluaron niveles séricos de corticosterona en organismos de 38 días de incubación y crías al momento justo de la emergencia del nido. Los resultados obtenidos mostraron que los organismos de NH (34.19 ± 0.64 ; n=6: 30) tanto los de 38 días, como los emergentes del nido, presentaron niveles inferiores a los de NN (33.59 ± 1.05 ; n=6: 30) (ANOVA anidada $F_{(12,32)} = 1.3205$, $p=0.255$). (Figura 10).

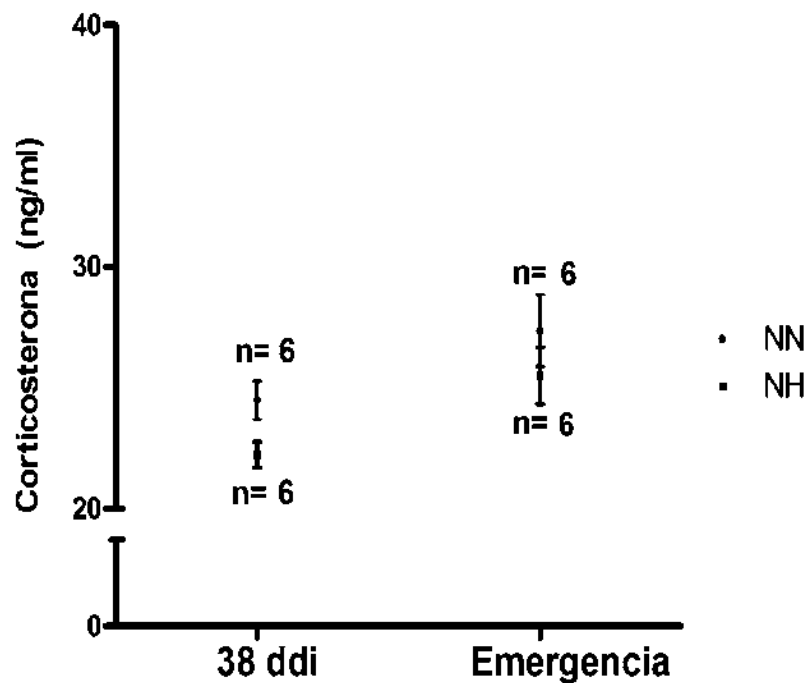


Figura 10. Gráfico que muestra los niveles séricos de corticosterona en organismos de 38 días de incubación y emergencia de NN y NH. Se presentan los promedios \pm Error estándar (ES) Números de nidos analizados (NN. n = 6, NH =6).

Para determinar si los eventos adversos presentados durante el desarrollo prenatal asociados a la incubación en NH perduran a través de un mediano plazo en el desarrollo postnatal (doce semanas), evaluamos los niveles séricos de corticosterona (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) en organismos sometidos a inmovilización una hora diaria durante una semana, bajo estas condiciones los resultados séricos de la hormona corticosterona mostraron que los organismos de NHi [1 hr] presentaron niveles superiores estadísticamente significativos frente a los organismos NNi [1 hr] posterior al haber transcurrido una hora de inmovilización (ANOVAS anidadas Wald $X^2(6)=207.93, p < 0.001$.Figura11).

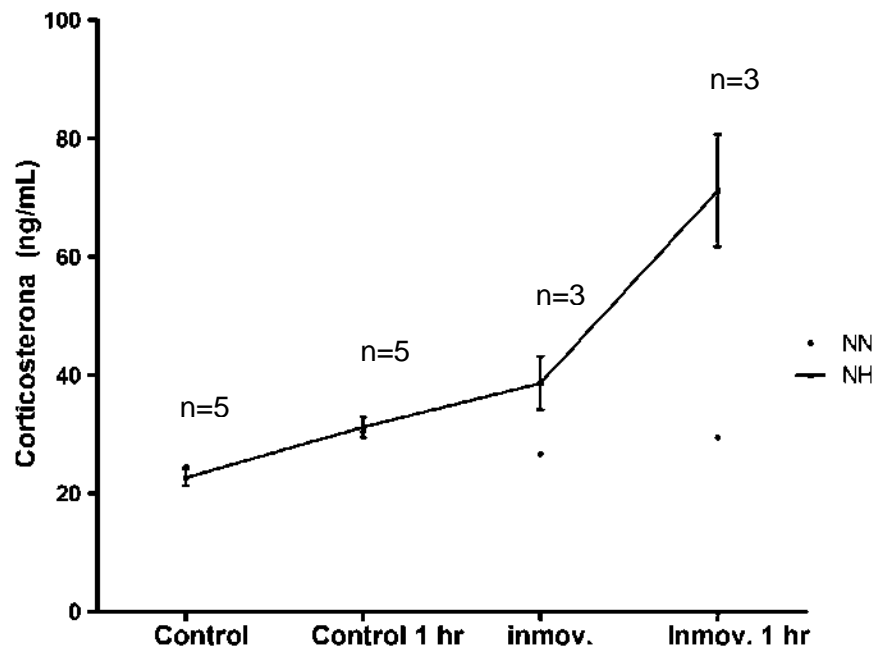


Figura 11. Niveles séricos de corticosterona en organismos controles de NN Y NH y sometidos a reto de inmovilización de NN y NH. Se presentan los promedios + Error estándar (ES) NN, n=Números de nidos analizados (NN. n = 5y 3 NH =5 y 3). (Control 0 hr y después de 1hr, Inmovilización 0 hr y después de una hora de la inmovilización).

9. Inmunohistoquímica para ACTH en hipófisis.

A partir de estos resultados que se presentan, fueron obtenidos de la colecta realizada en el año 2013 con n=2; 6 para NN y n=11 para NH. Como resultado de la inmunohistoquímica para ACTH, se observó que existe un aumento cualitativo de la inmunoreactividad a ACTH en la adenohipófisis de las células corticotropas en juveniles de *L. olivacea* de NHi con respecto a los de NNi (Figura 12).

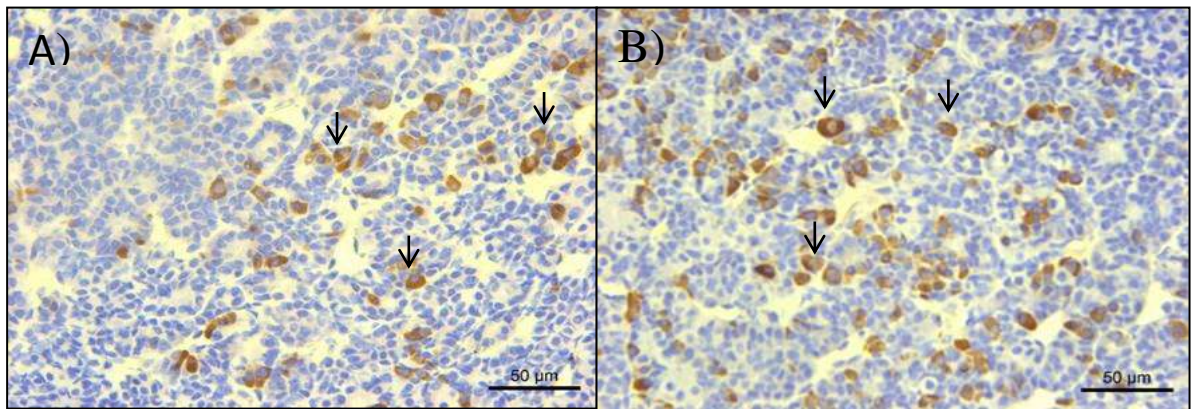


Figura.12. Fotomicrografía que ilustran la inmunoreactividad a ACTH en la hipófisis de tortuga marina. Fig. A (NNi) y B (NH). (Las flechas marcan las células corticotropas inmunoreactivas a ACTH). Cualitativamente es posible observar mayor cantidad de células inmunoreactivas a ACTH en tortugas nacidas de NH. Barra de escala 50μm.

10. Neuronas de la corteza dorsal y dorsomedial

Mediante la técnica de Golgi-Cox, se procedió al análisis de las estructuras de interés (corteza dorsal y dorsomedial). Las neuronas de las tortugas juveniles de NHi que fueron inmovilizadas mostraron una disminución del número de intersecciones dendríticas frente a las de los organismos de NNi (Wald $X^2(1)=19.470$, $*p=0.00001$) cuyas diferencias fueron estadísticamente significativa. El patrón de desarrollo de las neuronas de los organismos NHi mostraron en general menor número de intersecciones dendríticas (Fig. 13 A y B), pero estas tuvieron una mayor longitud, prolongándose hasta radios mayores de 800 μm de distancia desde su soma, mientras que las neuronas piramidales de los organismos NNi sólo se desplegaban a radios menores de 650 μm de distancia desde el soma (Figura 13 C).

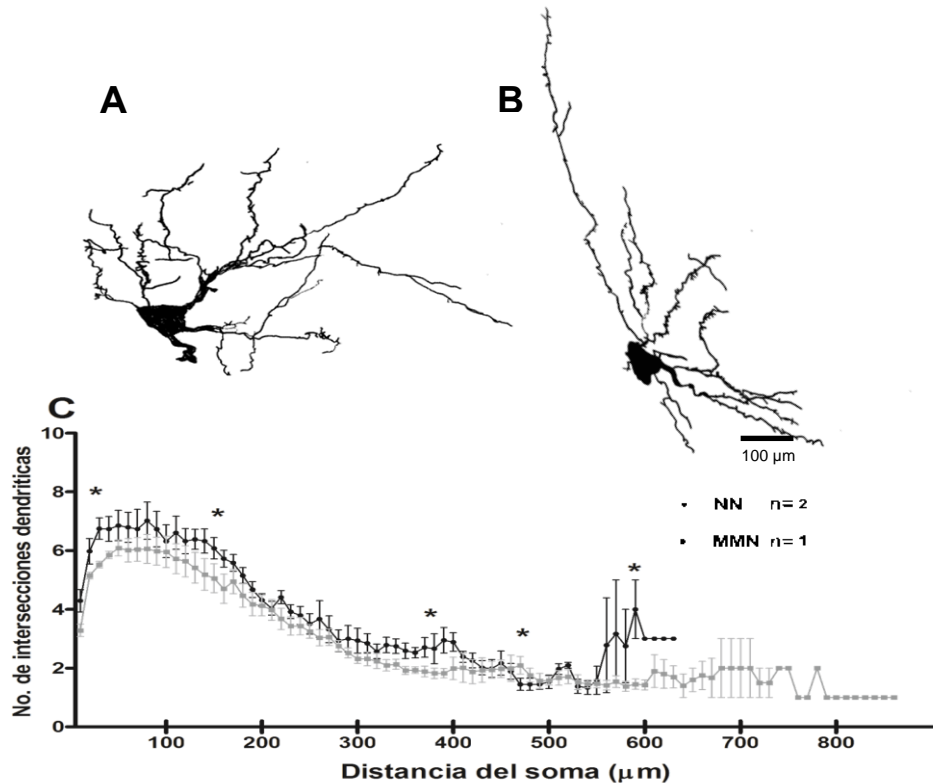


Figura 13. Neuronas piramidales de la corteza dorsal y dorsomedial de juveniles de 5 meses de edad de nidos hechos por el hombre inmovilizado (NHi) y de nidos naturales inmovilizados (NNi). (A) Representación esquemática en cámara de lucida de neuronas piramidales de las cortezas de NN y (B) de NH. Barra de escala = 100 μm . (C) Número promedio de intersecciones dendríticas respecto a la distancia desde el centro geométrico de su soma celular de neuronas piramidales de las cortezas juveniles NN y NH.

11. Análisis de las Células inter-renales

Como resultado del análisis densitométrico de las células inter-renales, el promedio del área nuclear de las células productoras de glucocorticoides fue significativamente mayor en los juveniles que emergieron de NHi (24.37 ± 0.50) que en aquellos que surgieron de NNi (19.07 ± 0.51) (Anova anidado $F_{(1, 14)}=44.878$, $*p= 0.00001$) (Figura 14 C). En consecuencia, la densidad nuclear de las células productoras de glucocorticoides en la glándula inter-renal disminuyó significativamente en NHi (1378.22 ± 41.32), en comparación con el NNi (1938.45 ± 129.76) (Anova anidado $F_{(1, 14)}=88.440$, $*p= 0.001$. Fig. 14 D). Finalmente, las observaciones cualitativas revelaron que las células productoras de glucocorticoides mostraron un citoplasma hipertrofiado en juveniles emergentes de NHi (Figura 14 A y 14 B).

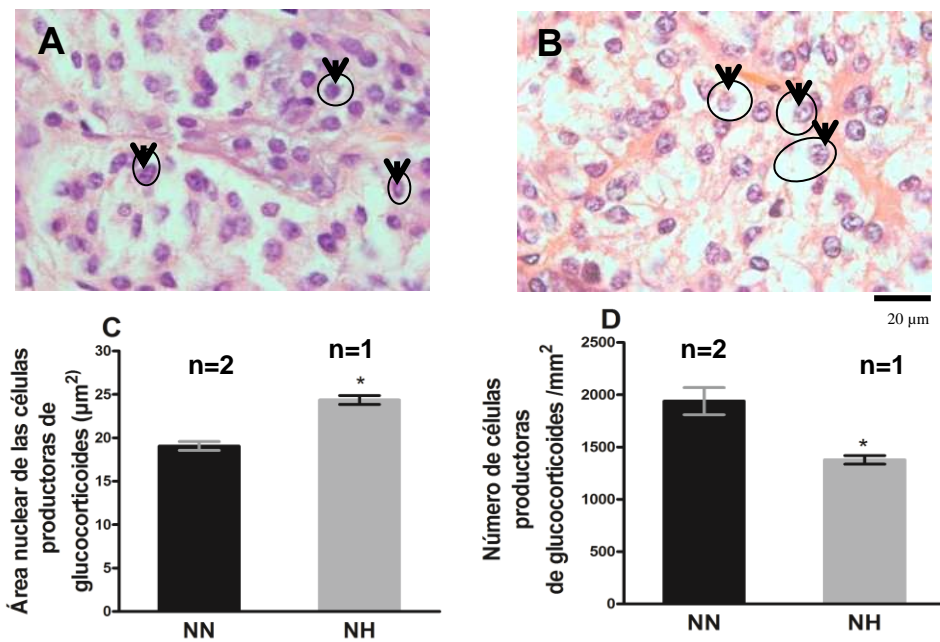


Figura 14. Las tortugas incubadas en nidos hechos por el hombre (NH) presentan una menor densidad de las células productoras de glucocorticoides que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN) en las glándulas inter-renales. (A) Fotomicrografías de secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina que muestran células productoras de glucocorticoides en la glándula inter-renal de pequeños juveniles de NN, (B) y de NH. Los núcleos celulares agrandados (flecha) y el citoplasma hipertrofiado en NH pequeños juveniles (círculo) son evidentes. Como los lípidos fueron eliminados durante el procesamiento histológico, el citoplasma se observa como un espacio en blanco que rodea los núcleos celulares. Barra de escala = 20 μm . C) Gráfico del área nuclear celular, D) Gráfico de la densidad de células nucleares.

12. Análisis gonadal

El análisis histológico testicular de pequeños juveniles inmovilizados presentaron una hipotrofia de las células germinales. Los testículos de NHi (29.50 ± 1.36), mostraron de manera cualitativa células hipotróficas intersticiales con respecto a los organismos NNi (27.98 ± 0.76). Por otro lado, el análisis de la densidad celular de las secciones testiculares mostraron una diferencia estadísticamente significativa en el número de células germinales en los organismos NN (2.427 ± 0.28) con respecto a la NH (1.790 ± 0.13) (Anova anidado $F_{(1,12)} = 4.5068$, $p = .05525$. Figura 15C).

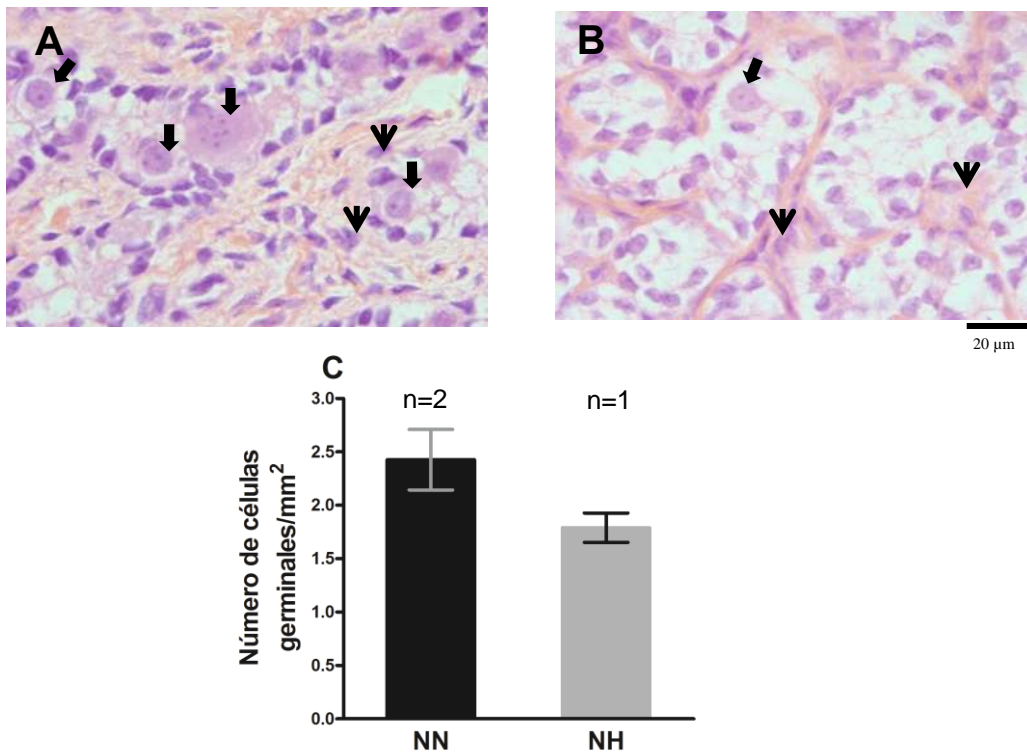


Figura 15. Las tortugas incubadas en nidos hechos por el hombre (NH) presentan una hipotrofia en las células germinales de las tortugas incubadas en nidos naturales (NN) en los glándulas gonadales masculinas. (A) Fotomicrografías de secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina que muestran las células germinales hipotróficas (flechas) de las glándulas gonadales masculinas de juveniles pequeños de NN (B) y de NH. Tenga en cuenta que los testículos de NH de los pequeños juveniles tienen células hipotróficas intersticiales (cabeza de flecha). El tejido conectivo que rodea los túbulos seminíferos es más compacto en NN que en NH juveniles pequeños. Barra de escala = 20 μm. C) Gráfico que muestra la densidad de las células germinales.

13. Discusión

A nivel global, la alternativa más utilizada para proteger a las poblaciones de tortugas marinas ha sido la creación de viveros, en los cuales los huevos ovipositados por las tortugas en nidos realizados por ellas (NN) son reubicados en nidos hechos por el hombre (NH), con el objetivo de proteger los huevos, embriones/fetos y crías de las tortugas marinas de los saqueos, la depredación y la erosión de las playas. Estudios realizados por el personal del Laboratorio de Eco-fisiología Animal del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, han documentado que la incubación en NH produce estrés embrionario/fetal crónico, conduciendo a una sobre-activación del eje HPI y alteraciones en la cito-arquitectura neuronal, inter-renales y gonadal en crías de *L. olivacea* (Herrera-Vargas *et al.* 2017). Con el fin de evaluar si los efectos en la programación del eje HPI y sus efectos sobre el cerebro, glándulas inter-renales y gónadas, observados en los neonatos de *L. olivacea* (Herrera *et al.* 2017), a la emergencia, persisten en etapas juveniles, tal y como se ha reportado en mamíferos (Lajud *et al.* 2012, Vazquez *et al.* 2013, Boonstra 2004), este trabajo analizó los parámetros neuroendócrinos relacionados con los efectos del estrés crónico impuesto por el ambiente incubatorio de NH en pequeños juveniles de 5 y 2 meses y medio de edad.

En primer término fueron evaluados parámetros morfométricos tales como peso corporal después de la inmovilización para la colecta 2013. Este resultado nos deja ver que el efecto observado por Herrera-Vargas *et al.*, 2017, en crías al momento de la emergencia se mantiene mostrando que las crías que fueron incubadas en NH tuvieron un menor peso corporal con valores estadísticamente significativos. En el presente trabajo no fue posible observar niveles superiores en los NH respecto de los NN basales en la temporada de 2013 y 2017, debido a que desafortunadamente la hormona corticosterona muestra picos muy cortos en la sangre después de los eventos de estrés, aunado posiblemente a la gran variedad de factores implicados, tales como, el ritmo circadiano, el grado de habituación que sufren los organismos en los distintos contextos en los que se desarrollan, a que otras hormonas pueden potenciar la secreción (ej. Vasopresina, ACTH, etc), incluso posibles infecciones, así como endotoxinas (Trevisi y Bertoni, 2009). Una gran cantidad de reportes en mamíferos muestran niveles basales inconsistentes de corticosterona durante las exposiciones crónicas al estrés, señalando que la sensibilidad de las glándulas adrenales incrementan durante los primeros días de las secuencias repetidas al estrés, la cual se mantiene sostenida y

consecuentemente los GC permanecen elevados (Rushen et al. 2007). No obstante los NH mostraron un incremento significativo en sus niveles de corticosterona cuando fueron sujetos a inmovilización crónica respecto de los NN inmovilizados, y este evento nos permitió una mejor evaluación de los niveles de respuesta al estrés, de hecho, los altos niveles de GC parecen mantenerse elevados cuando hay una falla del sistema para recuperar la homeostasis o después de la exposición al estrés (Romero 2004, Trevisi y Bertoni, 2009).

Por otro lado, los organismos muestreados durante la temporada del 2017 mostraron que partieron de huevos y fetos con iguales pesos, y un desarrollo exponencial desde cría emergente a juveniles. No obstante, la incubación bajo las condiciones artificiales del NH del vivero y la inmovilización detuvo en cierta medida que dicha tendencia continuara, ejerciendo un efecto sobre todo en los NH, los cuales mostraron la disminución estadísticamente significativa sobre peso corporal de estas frente a las de las condiciones control. Este resultado concuerda con lo reportado en infinidad de trabajos realizados en mamíferos en donde se muestra que la exposición a glucocorticoides provoca una disminución en el peso de los individuos (Harris y Seckl 2011). Mientras menor sea el peso al nacer mayores serán los riesgos sobre la salud, su importancia no sólo radica en lo que significa para la morbilidad y la mortalidad, sino que por lo general, presentarán en adelante múltiples problemas, tanto en el período perinatal como en las diferentes etapas de vida hasta la adultez de los sobrevivientes, se calcula que entre el 13 y el 24 % padecen trastornos neurológicos y entre el 6 y el 13 % déficit intelectual; repercutiendo en la adaptación social y calidad de vida (Álvarez *et al.* 2001, Aguila *et al.* 2011). Los mamíferos con restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) presentan en la vida posnatal una serie de alteraciones metabólicas y hormonales, y tienen predisposición al desarrollo de obesidad, hipertensión arterial, enfermedad cardiovascular, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. La exposición a un ambiente intrauterino desfavorable en fases críticas del desarrollo puede tener un efecto deletéreo sobre la gónada en formación (Martínez *et al.* 2017). El ambiente intrauterino desfavorable, quizá pueda equipararse al ambiente incubatorio desfavorable. El eje HPA en mamíferos y réptiles ha sido conservado durante la evolución y los mecanismos por los cuales es mediada su función fueron conservados durante la evolución (Ottaviani y Franceschi 1998, Flores *et al.* 2002).

En cuanto a niveles séricos de corticosterona 2013, los resultados mostraron sólo una tendencia a aumentar los niveles en pequeños juveniles incubados en NH (n=2=6), estos resultados pueden ser producto del número de muestra tan dispar que se tuvo sobre todo en el grupo NN (n=1=11) a causa

de la mortalidad tenida en cautiverio. Con respecto a los grupos sometidos a estrés por inmovilización se pudo observar un aumento significativo en los niveles de corticosterona en organismos nacidos de NH_i (n=6) *versus* los nacidos NN_i (n=6). Este resultado concuerda con lo reportado en mamíferos con respecto a que los individuos sometidos a estrés crónico en etapas tempranas de vida serán jóvenes o adultos con mayor sensibilidad a estímulos estresantes (Bonier *et al.* 2009). Lo anterior en términos de supervivencia tiene un impacto relevante. En la naturaleza, los organismos están sometidos a constantes pruebas o estímulos estresantes tales como presencia de depredadores y competencia por el alimento y la reproducción, entre otros. Así, el hecho de tener una respuesta aumentada o modificada con respecto de lo que sería la “norma” o lo “normal” puede modificar también la oportunidad de vida y oportunidad de dejar descendencia de la especie (Taché *et al.* 1980, Romero 2004.). En poblaciones como las de las tortugas marinas con diversos estatus de amenaza, resulta de mayor relevancia el saber que la incubación en nidos hechos por el hombre tiene estos efectos, sugiriendo que el eje HPI ha sido reprogramado en juveniles nacidos de NH en el corto y mediano plazo. En este sentido vale la pena hacer notar que está ampliamente documentado que en mamíferos, la exposición crónica al estrés durante el embarazo y las etapas postnatales de la vida son una condición que genera modificaciones permanentes de la función del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), con alteraciones persistentes en los niveles plasmáticos de la hormona glucocorticoide (Donaldson 1981; Pottinger y Carrick 1999; Schreck *et al.* 2001; Bhatnagar *et al.* 2005). Esto resulta importante ya que se ha mencionado en párrafos anteriores, dado que el eje HPA en mamíferos y réptiles los mecanismos por los cuales es mediada su función ha sido conservado durante la evolución (Ottaviani y Franceschi 1998; Flores *et al.* 2002).

Siguiendo con la descripción de los efectos del estrés crónico en las diversas estructuras involucradas en la función del eje HPI, se ha informado que el estrés crónico provoca hipertrofia suprarrenal, aumentando la capacidad productiva del tejido adrenocortical (Miller y Tyrrell 1995) que resulta en una mayor producción de glucocorticoides (Boonstra 2004). Los resultados de este trabajo, al igual que lo reportado por Miller y Tirrell (1985) y Herrera Vargas *et al.* (2017), muestran un menor número de células por unidad de área, así como un área nuclear mayor que es evidencia de hipertrofia celular en la glándula inter-renal para juveniles inmovilizados de *L. olivacea* incubados en NH_i *versus* pequeños juveniles inmovilizados de NN_i.

La activación del eje Hipotálamo-Hipofisario adrenal HPA o eje hipotálamo Hipofisario interrenal HPI para el caso de réptiles, comienza con un incremento en la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo hacia el sistema portal hipofisario, con la consiguiente liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) desde la hipófisis, hormona que estimula la secreción de hormonas esteroideas (como glucocorticoides) desde las glándulas adrenales en mamíferos (Bruson *et al.* 2003) e inter-renales en réptiles. Como un aporte al conocimiento del funcionamiento del eje HPI en tortugas marinas, se decidió analizar en este trabajo la expresión de la hormona ACTH en la glándula hipófisis a través de la técnica de inmunohistoquímica. El resultado obtenido muestra una mayor inmunoreactividad de las células secretoras de ACTH en la glándula hipófisis de juveniles de *L. olivacea* incubados en NH y sometidos a retos de estrés por inmovilización. En estos se observa que existe una mayor expresión de células secretoras de ACTH en la glándula hipófisis en juveniles de *L. olivacea* incubados en NHI y sometidos a reto de estrés por inmovilización, resultado consistente con lo mostrado para niveles séricos de corticosterona en este mismo grupo experimental.

En la última década, muchos estudios sobre el estrés se han centrado en el hipocampo en mamíferos (CD y CDM en réptiles son las homologías de la región; Aboitiz y Zamorano, 2013), Lo anterior por ser esta una área especialmente sensible a las variaciones de glucocorticoides durante las etapas postnatales tempranas (Gould 1999), pero también por su papel en la retroalimentación de la respuesta al estrés a través del eje HPA (Herman *et al.* 1989, Jacobson y Sapolsky 1991, Sapolsky *et al.* 1991, Herman y Cullinan 1997). Herrera-Vargas y otros (2017), así como otros autores (Brunton y Russell 2010, Brunton 2013, Liao *et al.* 2014) evidenciaron una asociación crónica de estrés temprano con hipotrofia neuronal en células del hipocampo y CD, CDM. En concordancia con lo anterior, en el presente estudio, las neuronas piramidales del CDM y CD de los pequeños juveniles nacidos de NH mostraron una reducción de la complejidad dendrítica de las neuronas piramidales de las áreas del cerebro CD y CDM, de acuerdo con lo que se ha descrito. Esto tiene amplias repercusiones más allá de la fisiología simple del eje, ya que esta área está involucrada en la codificación, almacen y recuperación de información, funciones que se ven afectadas en la vida adulta de los organismos (Fedulov *et al.* 2007, Aboitiz y Zamorano 2013).

Finalmente, se sabe que la exposición excesiva y prolongada a los glucocorticoides afecta el desarrollo gonadal a diferentes niveles (Paul *et al.* 2008, Pedrana *et al.* 2008). Los resultados

obtenidos mostraron un número significativamente menor de células germinales e hipoplásicas en los testículos en juveniles inmovilizados NHi versus juveniles de NN. Esto ha sido reportado previamente por Pedrana *et al.* (2008), lo que podría tener serias implicaciones en la eficiencia de la producción de hormonas sexuales y, por lo tanto, en la reproducción de individuos. Estos efectos han demostrado el potencial de afectar la capacidad reproductiva en la edad adulta porque el desarrollo de células testiculares está altamente correlacionado con la productividad y la calidad del esperma (Martin *et al.* 2010).

14. Conclusión

Los resultados de esta investigación permiten concluir que los efectos de estrés crónico embrionario por la incubación en NH descritos por Herrera-Vargas *et al.*, (2017) en tortugas al momento de la emergencia, persisten en juveniles inmovilizados de 5 y 2.5 meses (solo se evaluó niveles séricos) de edad provenientes de NH, tales como:

- Un aumento significativo en los niveles séricos de corticosterona.
- Inmunoreactividad de las células corticotropas,
- Hipertrofia de las células productoras de glucocorticoides en las glándulas inter-renales.
- Menor densidad de células germinales en las glándulas gonadales masculina.
- Neuronas piramidales con un número menor de intersecciones dendríticas.

Finalmente también es posible concluir que la respuesta del eje HPI a los desafíos de estrés en juveniles inmovilizados (NHi) parece haber sido reprogramada a largo plazo, con efectos adversos sobre las respuestas a estímulos de estrés mostrándose estas exacerbadas. Las posibles repercusiones de todo lo anterior nos llevan a pensar que el estado de la salud de individuos nacidos de NH a corto y largo plazo podría ser precaria, y por ende afectar la preservación de las poblaciones de tortugas marinas.

15. Bibliografía

- Abella, E. 2010. **Factores ambientales y de manejo que afectan al desarrollo embrionario de la tortuga marina *Caretta caretta*. Implicaciones en programas de incubación controlada.** Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España. 239 pp.
- Aboitiz, F. y F. Zamorano. 2013. **Neural progenitors, patterning and ecology in neocortical origins.** *Frontiers in Neuroanatomy* 7(38): 1-15. doi:10.3389/fnana.2013.00038.
- Aguila, A.C., D.D. Martínez, y M. Manzanarez, 2011. **Factores de riesgo asociados al bajo peso al nacer y al nacimiento pretérmico.** Área II. XXIII Fórum Estudiantil. Facultad de Medicina de Cienfuegos: Dr. Raúl Dorticós Torrado. Cienfuegos, Cuba.
- Aguilar, R.H. 1986. **Optimización del semicultivo de tortugas marinas y alternativas de manejo del recurso en el estado de Oaxaca.** Protocolo de investigación. *CIIDIR-IPN*. Unidad Oaxaca. 19 p.
- Aisa, B., R. B. Tordera, J. del Rio Lasheras, y Ramírez, M. J. 2007. **Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats.** *Psychoneuroendocrinology* 32(3):256-66.
- Álvarez, F. R., C. L. R. Urra, y S. M. Aliño. 2001. **Repercusión de los Factores de Riesgo en el Bajo Peso al Nacer** *RESUMED* 14(3):115-121.
- Ariens Kappers, C.U. 1929. **The evolution of the nervous system in invertebrates, vertebrates and man.** E F Bonh, Haarlem.
- Ariens Kappers, C.U., G.C., Huber, y E.C. Crosby 1936. **The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates, Including Man.** Reprinted 1960. Hafner, New York.
- Arriza, J.L., R.B. Simerly, L.W. Swanson, y R. M. Evans. 1988. **Neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response.** *Neuron* 1: 887– 900.
- Bennur S, B.S., R. Shankaranarayana, R. Pawlack, S. Strickland, B. S. McEwen, y S. Chattarji. 2007. **Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator.** *Neuroscience* 144:8-16.
- Bonier, F., P.R. Martin, I.T. Moore, y J.C. Wingfield. 2009 **Do baseline glucocorticoids predict fitness?** *Trends Ecol. Evol* 24 (11): 634–642.
- Boonstra, R. 2004. **Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds and mammals.** *Integr.com.Biol* 44:95-108.
- Boyle, L. M. 2013. **A Neuroplasticity Hypothesis of Chronic Stress in the Basolateral Amygdala.** *The Yale Journal of Biology and Medicine* 86(2):117.
- Buitrago, J. 2003. Amenazas naturales y antrópicas en tortugas marinas. http://www.invermar.org.co/redcostera1/invemar/docs/T01Amenazas_naturales.PDF.(Sin fecha).
- Brunson, K. L., Y. Chen, S. Avishai-Eliner, y T. Z. Baram. 2003. **Stress and the Developing Hippocampus. A Double-Edged Sword?.** *Molecular Neurobiology* 27:121-136.

- Brunton, P. J. y J. A. Russell. 2010. **Prenatal social stress in the rat programmer neuroendocrine and behavioral responses to stress in the adult offspring: sex specific effects.** *J. Neuroendocrinol* 22:258–271. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.01969.x
- Brunton, P. J. 2013. **Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring.** *Society for Reproduction and Fertility. Reproduction* 146:175–189.
- Bhatnagar, S. L. T. y C. Vining. 2005. **Prenatal stress differentially affects habituation of corticosterone responses to repeated stress in adult male and female rats.** *Hormones and Behavior* 47(4):430–438.
- Chacón, D. J., Sánchez, J. Calvo, y J. ASH. 2007. **Manual para el manejo y la conservación de las tortugas marinas en Costa Rica; con énfasis en la operación de proyectos en la playa y viveros.** Sistema Nacional de Áreas de conservación (SINAC), Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE). Gobierno de costa Rica. San José. 103 pp.
- Chrousos, G.P. 1998. **Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptive response.** *Ann. N.Y. AcadSci* 851:311–335.
- Dahlof, L.G. E. Hard, K. Larsson. 1978. **Influence of maternal stress on the development of the fetal genital system.** *PhysiolBehav* 20:193-195.
- Denardo y Lighr P. 1993. Effects of corticosterone on social behavior of male lizard. *Hormones and Behavior* 27:184–199.
- Denver, J. R. 2009. **Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development.** *General and Comparative Endocrinology* 164:20–31.
- Donaldson, E.M. 1981. **The Pituitary-interrenal Axis as an indicator of Stress in fish.** En Pickering AD (ed.), *Stress and fish..* Academic Press, London. pp. 11-47.
- Eckert K. L. Y S. A. Eckert. 1990. **Embryo mortality and hatch success in *In situ* and translocated leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea* eggs.** *Biological Conservation* 53(1):37–46. doi: 10.1016/0006-3207(90)90061-S
- Eckert, K. L. K. A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois, Y M. Donnelly. 1999. **Research and management techniques for the conservation of sea turtles.** 4ta ed. Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication. Washington, DC. 235 pp
- Fedulov, V. S. R. Christopher, A. Danielle, L. P. Simmons, M. G. Christine, y L. Gary. 2007. **Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning.** *J. Neurosci* 27:8031–8039.
- Flores, Q.C. 2002. **Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos.** *Rev.ictiol.*10 (1/2):57-78.
- Fuxe, K., A. C. Wikstrom, S. Okret, L. F. Agnati, A. Harfstrand, Z. Y. Yu, y L. Granholm, M. Zoli, W. Vale, J.A. Gustafsson. 1985. **Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel-and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor.** *Endocrinology* 117:1803–1812.

- Gould, E., A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves, T. y J. Shors. 1999. **Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation.** *Nat Neurosci* 2:260–265.
- Greenberg, N. y J. C. Wingfield. 1987. **Stress and reproduction: Reciprocal relationships.** *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles.* Wiley, New York. 389-426.
- Greenberg, N. 2002. **Ethological Aspects of stress in in model lizard *Anolis carolinensis*.** *Integ and Comp Biol* 42:526–540.
- Gluckman, P.D., M. A. Hanson, G. Hamish, Y. Spencer, P. Bateson, y P. Bateson. 2005. **Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies.** *Proc. R. Soc. B* 272(1564):671–677. doi:10.1098/rspb.2004.3001.
- Harris, A. y J. Seckl. 2011. **Jonathan Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease.** *Hormones and Behavior* 59(3):279–289. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.06.007
- Heim, C. y C. B. Nemeroff. 1999. **The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders.** *Biol. Psychiatry* 46(11):1509–22.
- Herman, J. P., M. K. Schafer, E. A. Young, R. Thompson, J. Douglass, H. Akil, S. J. Watson, S.J. 1989. **Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.** *J Neurosci* 9:3072–3082.
- Herman, J.P. y E. E. Cullinan. 1997. **Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.** *Trends Neurosci* 20(2):78-84.
- Herman, J. P., M. M. Ostrander, N. K. Mueller, y H. Figueiredo. 2005. **Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.** *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29 (8):1201-13.
- Herrera-Vargas, M. A., E. Meléndez-Herrera, G. Gutiérrez-Ospina, F. E. Bucio-Piña, A. Báez-Saldaña, H. H. Siliceo-Cantero, y A. L. Fuentes-Farías. 2017. **Hatchlings of the Marine Turtle *Lepidochelys olivacea* Display Signs of Prenatal Stress at Emergence after Being Incubated in Man-Made Nests: A preliminary Report.** *Frontiers in marine science* 400(4):1-9. doi: 10.3389/fmars.2017.00400.
- Jacobson, L. y R. M. Sapolsky. 1991. **The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.** *Endocr. Rev* 12:118– 134.
- Joels, M. y T. Z. Baram. 2009. **The neuro-symphony of stress.** *Nat Rev Neurosci* 10(6):459–466. doi:10.1038/nrn2632.
- Kapoor, A. y S. G. Matthews. 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):6406–6415. doi:10.1210/en.2008-0347.
- Kim, J. J. y K. S. Yoon. 1998. **Stress: metaplastic effects in the hippocampus.** *Trends in Neurosciences* 21:505-509.

- Kim, J. J. y D. M. Diamond. 2002. **The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories.** *Nat. Rev. Neurosci* 3(6):453–462
- Kyrou, I. y C. Tsigos. 2008. **Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction.** *Hormones* 7 (4), 287–93.
- Lajud, N., A. Roque, M. Cajero, G. Gutierrez-Ospina, L. Torner. 2012. **Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood.** *Psychoneuroendocrinology* 37(3):410-420 doi:10.1016/j.psyneuen.2011.07.011
- Abreu,-G. A. y P. Plotkin. (IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group). 2008. *Lepidochelys olivacea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T11534A3292503. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11534A3292503.en> (Accesada junio 2008)
- Liao, X. M., X. D. Yang, J. Jia, J. T. Li, X. M. Xie, Y. A. Su, M. V. Schmidt, T. M. Si, y X. D. Wang. 2014. **Blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 attenuates early-life stress-induced synaptic abnormalities in the neonatal hippocampus.** *Hippocampus*. 24(25):528–540.
- Lopes-Souza, A., A. Schiavetti, y M. R. Álvarez. 2015. **Analysis of marine turtle strandings (Reptilia: Testudine) occurring on coast of Bahia State. Brazil.** *Lat. Am. J. Aquat. Res* 43(4):675-683. doi:10.3856/vol43-issue4-fulltext-6.
- López-Correa J. Y. 2010. **Diferenciación gonádica en crías de *lepidochelys olivacea* (eschscholtz, 1829) (testudinata: cheloniidae).** Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz Baja California Sur. 108 pp.
- López-Vargas, M. 2015. **Evaluación del efecto de la separación maternal en ratas sobre la integración de células granulares en el giro dentado de hipocampo.** Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. 59 pp.
- Magariños, A. M., B. S. McEwen, G. Flugge, y E. Fuchs. 1996. **Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews.** *J. Neurosci* 16(10):3534–3540.
- Mandyam, C. D., E. F. Crawford, A. J. Eisch, C. L. Rivier, y H. N. Richardson. 2008. **Stress experienced in utero reduces sexual dichotomies in neurogenesis, microenvironment, and cell death in the adult rat hippocampus.** *Developmental Neurobiology* 68(5):575–589. doi:10.1002/dneu.20600.
- Marcovaldi, M. A. y A. Laurent. 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):55-59.
- Márquez, M. R. 1996. **Las tortugas marinas y nuestro tiempo.** 1 edición. Fondo de Cultura Económico, D. F., México. 104 pp.
- Maras, P. M. y T. Z. Baram. 2012. **Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH.** *Trends in Neurosciences* 35 (5):315-324.
- Martin, G.B., D. Blache, D. W. Miller, y P. E. Vercoe. 2010. **Interactions between nutrition and reproduction in management of the mature male ruminant.** *Animal* 4(7):1214–1226.

- Martínez, A., T. Pasqualini, V. Bengolea, M. Azaretzky, F. Kuspiel, E. Vaiani, S. Campeni, V. Pipman, y M. Suárez. 2017. **Función gonadal en niños y adolescentes nacidos con restricción del crecimiento intrauterino.** *Rev argent endocrinol metab.* 54(4):196–203.
- Matteri, R. L., J. A. Carroll, y C. J. Dyer. 2000. **Neuroendocrine responses to stress.** En Cab international (Ed.) **In The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare** Department of Animal Science, University of California, Davis, USA. pp 43-76.
- Meaney, M. J., J. Diorio, D. Francis, J. Widdowson, P. LaPlante, C. Caldji, S. Sharma, J. R. Seckl, y P. M. Plotsky. 1996. **Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress.** *Dev Neurosci* 18(1-2):49-72.
- Meisel, R. L., G. P. Dohanich, y I. L. Ward. 1979. **Effects of prenatal stress on avoidance acquisition, open-field performance and lordotic behavior in male rats.** *Physiol Behavior* 22(3):527-530.
- Miller, W. L., y J. B. Tyrrell. 1995. **The adrenal cortex.** In: Felig, P.; Baxter, J.D.; and Frohman, L.A., eds. *Endocrinology and Metabolism.* New York: McGraw-Hill.
- Mitra, R., S. Jadhav, B. S. McEwen, A. Vyas, y S. Chattarji. 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.
- Montenegro, S. B., N. Bernal y A. Martínez. 1984. **Estudio del contenido estomacal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, en la costa de Oaxaca, México.** *An. Inst. Cienc. Mar. Limnol.* Universidad Nacional Autónoma de México..
- Moorreale, S. J., G. J. Ruiz, J. R. Spotila, y E. A. Standora. 1982. **Temperature dependent sex determination: current practices, threaten conservation of sea turtles.** *Science* 216: 1245-1247.
- Morales, M. J. C., F. Sanchez, G. Flores, Y. Dumont, y R. Quirion. (2009). **Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus accumbens and amygdala in the rat.** *Journal of Chemical Neuroanatomy* 38(4):266–272. doi:10.1016/j.jchemneu.2009.05.009.
- Mulder, E. J., H. P. G. Robles de Medina, A. C. Huizink, B. R. H. Van, den Berg, J K Buitelaar, y G. H. A. Visser. 2002. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child *Early Human Development* 70: 3-14.
- McEwen BS, Wingfield JC. 2003. **The concept of allostasis in biology and biomedicine.** *Horm. y Behav* 43:2-15.
- Myers, B., J. M. McKlveen, y J. P. Herman. 2012. **Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback.** *Cellular and molecular neurobiology* 32(5):683-694.
- McLeod, P. J., y R. E. Brown. 1988. **The effects of prenatal stress and postweaning housing conditions on parental and sexual behavior of male Long-Evans rats.** *Psychobiology* 16(4):372-380.
- Mrosovsky, N. 2008. **Against over simplifying the issues on relocating turtle eggs.** *Environmental Management* 41:465–467.

- Norris, O., D. y K. López. 2010. **Hormones and Reproduction of Vertebrates.** *Mammals. Ed. Elsevier* 5:400.
- Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT). <http://www.profepa.gob.mx>(Accesada diciembre 2010).
- Northcutt, R. G. 1981. **Evolution of the telencephalon in nonmammals.** *Annu Rev Neurosci* 4:301-350.
- Osadchuk, L.V., B. O. Braastad y M. Bakken. 2000. **Influence of prenatal stress on steroidogenesis in gonads of blue foxes.** *Russ j of Dev Biol* 31(3):181-185.
- Ottaviani, E. y C. Franceschi. 1998. **A new theory on the common evolutionary origin of stress response. The invertebrate phagocytic immunocyte as an eye witness.** *Domestic Animal endocrinology* 15:291-296.
- 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(3): 487-91.
- Paul, C., A. A. Murray, N. Spears, y P. T.Saunders. 2008. **A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice.** *Society for Reproduction and Fertility* 136(1):73-84. doi:10.1530/REP-08-0036 ISSN 1470–1626.
- Pedrana, G., D. M. Sloboda, W. Pérez, J. P. Newnham, A. Bielli, y G. B. Martin. 2008. **Effects of pre-natal glucocorticoids on testicular development in sheep.** *Anat Histol. Embryol* (5):352-8.
- Pottinger, T. G. y T. R. Carrick. 2000. **Indicators of reproductive performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) selected for high and low responsiveness to stress.** *AquacultureResearch* 31:367–375.
- Pritchard, P. C. 2000. **Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies.**Páginas 23-42. En: **Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas.** Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds.) Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE, Pensilvania.
- Phillot, A. D. y C. J. Parmenter. 2012. **Anti-fungal Properties of Sea Turtle Cloacal Mucus and Egg Albumen.** *Marine Turtle Newsletter* 134:17-21.
- Reece, S.E., B. J. G. ACB, y S. A. West. 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.
- Reiner, A. 1991. **A comparison of the neurotransmitterspecific and neuropeptide-specific neuronal cell types present in turtle cortex to those present in mammalian isocortex: implications for the evolution of isocortex.** *Brain Behav Evol.* 38:53-91.
- Rodríguez, N. N. Mayer, y F. H. Gauna. 2007. **Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity.***Biocell* 31(1):67-74.
- Romero, L. M. 2004. **Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research.** *Tree* 19(5):249-255.

- Richardson, H. N. 2006. **Exposure to Repetitive Versus Varied Stress during Prenatal Development Generates Two Distinct Anxiogenic and Neuroendocrine Profiles in Adulthood.** *Endocrinology* 147(5):2506–2517. doi:10.1210/en.2005-1054.
- Rushen, J., A. M.D. Passillé, M. A.G.V., Keyserlingk, y D. M. Weary. 2007. *The welfare of cattle. Series: Animal Welfare. Springer Ed., 5*, Amsterdam, The Netherlands. X- 310.
- Sapolsky, R. M., S. Z. Morgan, y L. R. Squire. 1991. **Inhibition of Glucocorticoid Secretion by the hippocampal formation in the Primate.***The journal of neuroscience*, 11(2):3695-3704.
- Secretaría CIT. 2004. **Una Introducción a las Especies de Tortugas Marinas del Mundo.** Secretaría Pro Tempore de la Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas (CIT), San José, Costa Rica.
- Schreck, C.B.W. Contreras- Sanchez, y M. S. Fitzpatrick. 2001. **Effects of stress on fish reproduction gamete quality and progeny.***Aquaculture* 197:3–24.
- Shen, J. M. y A. R. Kriegstein. 1986. **The hippocampal Cortex Contains Distinct Cell Types, Burst-Firing Neurons, and an Epileptogenic Subfield.** *Journal of Neurophysiology* 56(6):1626-1649.
- Shors, T. J. 2001 **Acute stress rapidly and persistently enhances memory formation in the male rat.** *Neurobiol Learn Mem* 75:10–29.
- Stewart, M. G., H. A. Davies, C. Sandi, I. V. Kraev, V. V. Rogachevsky, C. J. Peddie, y V. I. Popov. 2005. **Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: A three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities.** *Neuroscience* 131(1):43–54. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.10.031
- Stratakis, C. A. y G. P. Chrousos. 1995. **Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system.** *Ann. N.Y. Acad. Sci* 771:1-18.
- Taché, V., J. R. Ducharme, C. Charpenet, F. Haour, J. Saez, y R. Collu. 1980. **Effect of chronic intermittent immobilization stress on hypophysogonadal function in rats.** *Acts Endocrinol* 93:168-174.
- Tsigos, C., I. Kyrou, E. Kassi, Y, y G. P. Chrousos. 2016. **Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology.** *ENDOTEXT.* Adapted from Chrousos G.P. and Gold P.W., JAMA, 1992; 267,1244.
- Trevisi E. y G. Bertoni. 2009. **Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows.** *Italian Journal of Animal Science*, 8(1): 265-286. Doi: 10.4081/ijas.2009.s1.265.
- Ulinski, P. S. 1990. **The cerebral cortex of reptiles.** 5ta ed. Department of organismal biology and anatomy, and committee on neurobiology. University of Chicago. Chicago Illinois 60637. pp77.
- Varo, C. N., A. C. Monzón, M. Carrillo, P. Calabuig. y A. L. Loza. 2015. **Tortugas olivácea-Lepidochelys olivacea (Eschscholtz, 1829).** En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Marco, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. 28 pp.

Vásquez, B., C. Sandoval, C. Sanhueza, J. Silva. y M. del Sol. 2013. **Efectos de las Experiencias Adversas Temprana y Tardía en las Características Morfométricas y Estereológicas de la Glándula Suprarrenal de Ratas Sprague Dawley Sometidas a Estrés Durante su Vida Adulta.** *Int. J. Morphol* 31(1):15-22.

Vyas, A., R. Mitra, R. B. S. Shankaranarayana, y S. Chattarji. 2002 **Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons.** *J Neurosc* 22(15):6810-6818.