



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

Opción Recursos Bióticos

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ESTRÉS
ASOCIADOS A LA INCUBACIÓN DE HUEVOS EN NIDOS
HECHOS POR EL HOMBRE Y A LA RETENCIÓN DE
NEONATOS DE TORTUGA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*)**

TESIS DE DOCTORADO

Ma. Antonia Herrera Vargas

DIRECTORA DE TESIS: Alma Lilia Fuentes Farías

CO-DIRECTORA: Esperanza Meléndez Herrera

Morelia, Michoacán

Agosto, 2018

DEDICATORIA

Dedico de manera muy especial a mi preciosa hija Estrella por quien ningún sacrificio es suficiente, su luz ha llenado mi vida e ilumina siempre mi camino.

A mi esposo Jesús G. pues ha sido el principal impulsor de mi superación profesional, que con su apoyo constante ha sido un amigo insuperable, fuente de consejo en todo momento.

A mis madres Ma. Rosa Vargas y Enriqueta Herrera quienes con su amor y sacrificio han sentado las virtudes que se necesitan para vivir con anhelos, felicidad y fortalezas.

A mi tía Manuela Vargas por todo su apoyo, cuidado y consejo.

Y a mi padre Tomás Herrera Rangel† por ser ejemplo de gran persistencia ante las metas que impone la vida.

AGRADECIMIENTOS

A nombre de todos los participantes, deseo expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de esta tesis mediante los proyectos no. 180762 y 258747. Y por la beca de manutención brindada (CVU 257690).

Deseo expresar mi agradecimiento a las personas que con su comprensión y ayuda hicieron posible la cristalización de una idea; Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Profesor investigador del Instituto de Biomédicas, UNAM; Dra. Alma Lilia Fuentes, Directora del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA); Dra. Esperanza Meléndez Herrera, Profesora investigadora del INIRENA; Dra. Armida Báez Saldaña, Profesora investigadora del Instituto de Biomédicas, UNAM; y al Dr. Bryan Víctor Phillips Farfán, Profesor investigador del instituto nacional de pediatría.

De la misma forma, deseo expresar mi gratitud y reconocimiento a las Dras. Alejandra Ochoa, Profesora investigador del CMEB y Elva Mayra Toledo Cuevas, profesora investigadora del IIAF, por su valiosa participación en las sesiones tutorales.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Héctor Hugo Siliceo-Cantero, por las clases de estadística, por la ayuda moral y por su amistad.

Deseo hacer patente mi agradecimiento también a los integrantes del grupo de trabajo, quienes con gran entusiasmo, responsabilidad y sentido de colaboración contribuyeron con el apoyo logístico necesario para la realización de las colectas de campo, procesamiento de muestras en el laboratorio, asistencia técnica y análisis de resultados, cabe destacar la participación de las siguientes personas: Fany Edith Bucio Piña, Hugo Olivera Rodríguez, Edel Pineda López, Saúl González de la luz, Delia Adriana López Valencia, Lluvia Itzihuari Marcos Camacho, Verónica Higareda Magaña, Lizbeth Vicente y Alejandra Castellón.

CONTENIDO

I.	RESUMEN GENERAL	1
II.	GENERAL SUMMARY	2
III.	INTRODUCCIÓN GENERAL	4
IV.	ANTECEDENTES	7
4.1	Densidades poblacionales de tortuga marina	7
4.2	Taxonomía, identidad y abundancia de tortuga golfina	8
4.3	Salvaguarda de los huevos, una medida de conservación: Efectos negativos	10
4.4	Estrés y activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal	15
4.5	Control central del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal	19
	4.5.1 <i>Hipocampo</i>	19
	4.5.2 <i>Corteza dorso-medial de reptiles y su homología al hipocampo</i>	22
4.6	Exposición crónica a estrés y sus efectos sobre el hipocampo	28
4.7	Exposición al estrés y su efecto sobre la reproducción	30
V.	HIPÓTESIS	34
VI.	OBJETIVOS	35
6.1	OBJETIVO GENERAL	35
6.2	OBJETIVOS PARTICULARES	35
VII.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	36
VIII.	RESULTADOS	39
IX.	CAPÍTULO I	

INTRODUCTION

MATERIALS AND METHODS

Study site and nesting conditions

Hatchlings collection

Corticosterone serum levels

Histological procedures

Quantitative organ cyto-morphology

Inter-renal glands

Testes

Neurons

Statistical analyses

RESULTS

Macroscopic measures

Glucocorticoid-producing cells

Corticosterone serum levels

Testicular cytology

Morphology of pyramidal neurons

DISCUSSION

AUTHOR CONTRIBUTION

FUNDING

ACKNOWLEDGEMENTS

SUPPLEMENTARY MATERIAL

REFERENCES

X. CAPÍTULO II.

Efectos de la exposición prenatal al estrés asociado a la incubación artificial, sobre el desarrollo de la tortuga golfina (*lepidochelys olivacea*) 50

Resumen

Summary

Introducción

Metodología

Grupos experimentales

Obtención de los organismos

Obtención y procesamiento de sangre y órganos

Análisis de datos

Resultados preliminares

Análisis morfométricos

Masa y longitud corporal

Índices corporales

Niveles séricos de corticosterona

Citoarquitectura neuronal

Discusión

Agradecimientos

Referencias

XI. CAPÍTULO III

Efectos de la retención de neonatos post-emergentes de tortuga marina sobre la regulación del eje hipotalámico–hipofisiario-interrenal 57

Resumen

Introducción

Metodología

Sitio de estudio y condiciones de incubación

Colecta de las crías

Niveles séricos de corticosterona

Análisis estadísticos

Resultados

Medidas Macroscópicas

Peso de crías de L. olivacea

Medidas de caparazón y plastrón de crías de L. olivacea

Niveles séricos de corticosterona de crías de L. olivacea

Discusión

Conflictos de interés

Contribución de los autores

Fondos

Agradecimientos

Literatura citada

XII. DISCUSIÓN GENERAL	68
XIII. CONCLUSIÓN GENERAL	76
XIV. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN	76
XV. RECOMENDACIONES GENERALES	77
XVI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	78

ÍNDICE DE FIGURAS GENERALES

Figura 1. Tortuga golfina (<i>Lepidochelys olivacea</i>)	9
Figura 2. Representación esquemática del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal en vertebrados	17
Figura 3. Curvas de niveles de respuestas entre la potencia de un estresor impuesto y la actividad de los componentes del sistema de estrés que responden al mismo	18
Figura 4. Representación esquemática de las proyecciones hipocampales en las respuestas al estrés	21
Figura 5. Esquema representando los hemisferios cerebrales de reptiles y mamíferos	23
Fig. 6. Representación esquemática que muestra los principales tipos de neuronas y la organización trilaminar de la corteza dorsal de la tortuga	24
Figura 7. Esquemas de las capas / subdivisiones, tipos de células y conexiones principales de la neocorteza de mamíferos y corteza dorsal reptiliana	26

ÍNDICE DE TABLAS GENERALES

Tabla 1. Muestreo que se llevó a cabo, los momentos de recolección, los órganos recolectados y el sexo de los organismos	37
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO I

Figure 1. Photomicrographs of histological sections stained with hematoxylin-eosin showing glucocorticoid-producing cells in the interrenal gland of hatchlings that emerged from NN (A) or MMN (B).

Figure 2. Photomicrographs of histological sections showing epithelial cells of seminiferous cords in NN (A) and MMN (B) hatchlings.

Figure 3. (A) Representative camera Lucida drawings of Golgi-impregnated pyramidal neurons located in the dorso-medial cortex of an NN (upper panel) and of an MMN (lower panel) hatchling.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS DEL CAPÍTULO II

Figura 1. La incubación artificial en viveros modifica el desarrollo de la tortuga *L. olivacea* causada por la exposición crónica al estrés durante su desarrollo embrionario/fetal.

Figura 2. La incubación en nidos artificiales modifica la citoarquitectura neuronal en regiones cerebrales involucradas en la modulación del eje HHA causada por la exposición crónica al estrés durante su desarrollo embrionario/fetal.

ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO III

Figura 1. Mapa geográfico del sitio de estudio.

Figura 2. Sitio de Estudio

Figura 3. Las crías de *L. olivacea* mostraron una reducción del peso como efecto de la retención.

Figura 4. Las crías de *L. olivacea* emergidas y retenidas de incubación en nidos hechos por el hombre mostraron una mayor anchura del caparazón.

Figura 5. El gráfico muestra los niveles séricos de corticosterona en las crías de *L. olivacea* desde su emergencia y hasta las 12 horas de haber sido retenidas de nidos naturales (NN) y nidos hechos por el hombre (NHH).

I. RESUMEN GENERAL

La reubicación de los huevos y su incubación en nidos hechos por el hombre (NHH) así como la retención de crías durante horas antes de ser liberadas al mar, son las prácticas más comunes para la conservación de las poblaciones de tortugas marinas a nivel mundial. No obstante, estas medidas están asociadas con 1) la reducción de las tasas de eclosión, 2) la alteración de la proporción sexual, 3) la precaria salud de las crías, 4) la deshidratación y/o consumo de energía, después de ser retenidas por 3 y 6 horas. Estudios precedentes han demostrado que los NHH y los nidos naturales (NN) proporcionan diferentes entornos de incubación. Los desafíos de la incubación impuestos por las condiciones del NHH *in ovo*, así como la retención post-emergencia, podrían inducir respuestas crónicas al estrés, las cuales pueden tener efectos sobre la morfología funcional de diversos órganos de las crías a corto y largo plazo. No existe, hasta el momento, evidencia de la exposición crónica al estrés y sus efectos asociados con medidas de conservación en tortugas. En este trabajo probamos la hipótesis de que la incubación en NHH expone a los embriones/fetos de tortuga marina a condiciones prenatales crónicas estresantes y genera la desregulación post-natal de las respuestas del eje hipotalámico-hipofisario-interrenal (HPI). Dado que el eje HPI comienza a funcionar el día 11 de incubación en reptiles, nuestros experimentos exploraron los efectos de las condiciones de incubación, en lugar de las asociadas con la translocación, sobre las respuestas crónicas al estrés embrionario/fetal. Los resultados obtenidos demuestran que las crías de *Lepidochelys olivacea* incubadas en NHH, emergen con un peso corporal reducido, glándulas interrenales hipertróficas, hipotrofia testicular y neuronas piramidales de la corteza dorsomedial hipotróficas, en comparación con las crías que emergen de NN. En concordancia, las crías de NHH presentaron mayores niveles séricos de corticosterona al momento de la emergencia y mostraron una respuesta atenuada a estímulos estresantes agudos y crónicos, tales como la llegada al mar y ser retenidas durante 12 horas, respectivamente. En conclusión, estos hallazgos evidencian que, la incubación de los huevos para protegerlos y la retención de las crías exponen de manera crónica al estrés a los embriones/ fetos y neonatos de la tortuga marina, lo cual, podría tener un impacto negativo en la salud y la supervivencia de sus poblaciones. Por lo tanto, la reubicación e incubación en condiciones artificiales de viveros deben emprenderse cuando no haya

otra alternativa disponible, o en su defecto, estas actividades deberían ser replanteadas como estrategias de conservación. A su vez, es recomendable que la retención de neonatos sea evitada en lo posible.

Palabras clave: Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, complejidad neuronal, gónadas y cordones seminíferos.

II. GENERAL SUMMARY

Egg relocation and their incubation in man-made nests (NHH), as well as, the hatchlings retention for hours before being released into the sea, once they emerge from NHH, are worldwide the most common practices for the conservation of sea turtle populations. However, these measures are associated with 1) the reduction of hatching rates, 2) the alteration of the sexual proportion, 3) the precarious health of the offspring, 4) the dehydration and / or energy consumption after being retained for 3 and 6 hours. Previous studies have shown that NHH and natural nests (NN) provide different incubation environments. The challenges of incubation imposed by the NHH *in ovo* conditions, as well as the post-emergence retention, could induce chronic responses to stress, which can have effects on the functional morphology of various organs of the offspring in short and long term. Until now, there is no evidence of chronic exposure to stress and its effects associated with conservation measures in turtles. In this work, we tested the hypothesis that incubation in NHH exposes sea turtle embryos / fetuses to stressful prenatal chronic conditions and generates the post-natal de-regulation of hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis responses. Since the HPI axis starts functioning on day 11 of incubation in reptiles, our experiments explored the effects of incubation conditions, rather than those associated with translocation, on chronic responses to embryonic / fetal stress. The results obtained show that the *Lepidochelys olivacea* hatchlings incubated in NHH, emerge with a reduced body weight, hypertrophic interrenal glands, testicular hypotrophy and hypotrophic pyramidal neurons of the dorsomedial cortex, in comparison with the hatchlings emerged from NN. In agreement, the NHH hatchlings presented higher serum corticosterone levels at the time of emergence and showed an attenuated response to acute and

chronic stressors, such as arrival at sea and being retained for 12 hour, respectively. In conclusion, these findings show that the incubation of the eggs to protect them, as well as the hatchlings retention, expose to chronic stress to embryos / fetuses of sea turtle hatchlings. Which, could have a negative impact on the health and survival of their populations. Therefore, relocation and incubation under artificial nursery conditions should be undertaken when there is no other alternative available, or failing that, these activities should be rethought as conservation strategies. At the same time, it is recommended that the retention of neonates be avoided as much as possible.

Key words: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuronal complexity, gonads and seminiferous cords.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las tortugas marinas contribuyen de manera relevante a la salud y al mantenimiento de los complejos hábitats oceánicos y costeros (por ej. praderas de pastos marinos, arrecifes coralinos, estuarios y playas arenosas. Eckert *et al.*, 1999). No obstante, en la actualidad se encuentran catalogadas como especies amenazadas (Sarti *et al.*, 2007; Seminoff y Shanker, 2008; Wallace *et al.*, 2006; 2011). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés: International Union for Conservation of Nature, <http://www.iucn.org>) clasifica a las tortugas marinas de acuerdo con las siguientes categorías: “vulnerables”, “en peligro” o “en peligro crítico” a la extinción. Estas categorías reflejan el estado actual de cada especie respecto de sus fluctuaciones poblacionales a nivel global.

Por consiguiente, se han desarrollado estrategias de conservación, las cuales deben respaldar programas integrales, orientados a prevenir la extinción de las especies, promover la recuperación y el sostenimiento de poblaciones saludables de tortugas marinas que realicen eficientemente sus funciones ecológicas (Eckert *et al.*, 1999). Una de las estrategias implementadas en las principales playas de desoves en el mundo es la creación de viveros, donde son reubicados los huevos recién ovipositados por las hembras (Eckert *et al.*, 1999).

Esta medida implica el expolio (desentierro o apropiación), traslado, manejo y re-entierro de los huevos a nidos hechos por el hombre (NHH), los cuales son construidos en la misma playa bajo estándares internacionales (Van De Merwe *et al.*, 2002; 2005). Durante dichas maniobras, los huevos son trasladados y expuestos a movimientos de rotación y/o vibración causada por la manipulación (Chan *et al.*, 1985), lo cual afecta negativamente el desarrollo embrionario de los organismos (Limpus *et al.*, 1979) y genera alta mortalidad (Aubret *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, la exposición a la intemperie provoca la desecación del mucus transparente que recubre los huevos de tortuga, el cual posee propiedades anti-patógenas (Phillot y Parmenter, 2012). Aunado a lo anterior, la arquitectura del NHH es diferente de aquella del nido natural (NN), construido por la hembra anidante (Turtle y Rostal, 2010). Estudios previos han demostrado que los NHH

proporcionan un entorno diferente de incubación diferente frente a los NN, caracterizados por un porcentaje menor de humedad, mayor proporción de arenas finas (Arzola-González, 2007) y mayor abundancia de microorganismos, esto último, por el uso del mismo sustrato (arena) temporada tras temporada (Patino-Martínez *et al.*, 2012) y el contenido de materia orgánica acumulada (Bézy *et al.*, 2014). Dichas circunstancias probablemente imponen retos y/o exponen de manera crónica al estrés a los organismos *in ovo*.

Otra práctica implementada en los viveros es la retención de las crías durante varias horas poco después de la emergencia (Van de Merwe *et al.*, 2013). Desafortunadamente, esta práctica también podría promover la exposición crónica al estrés post-emergencia durante la etapa de frenesí, definida como el período crítico en el que las crías tratan de evitar la depredación tanto en tierra como en el mar (Wyneken y Salmon, 1992; Pilcher y Enderby, 2001; Burgess *et al.*, 2006; Ischer *et al.*, 2009).

El estrés es una respuesta fisiológica provocada por estímulos que desafían la homeostasis del organismo. En el caso de mamíferos, durante la exposición al estrés, el sistema nervioso simpático y el eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (HPA, por sus siglas en inglés: hypothalamic–pituitary–adrenal axis o HPI en reptiles, por sus siglas en inglés: hypothalamic–pituitary–interrenal axis) son activados y la secreción de varias hormonas es estimulada. Entre las principales hormonas que aumentan su liberación en respuesta a un estresor se encuentran la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés: corticotropin releasing hormone), la adrenocorticotropina (ACTH, por sus siglas en inglés: adrenocorticotropic hormone), los glucocorticoides (GC. Nombre de la familia de las hormonas corticoideas) y las catecolaminas (Donaldson, 1981; Pottinger y Carrick 2000; Schreck *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2005).

Ante un estresor agudo, el sistema nervioso simpático y el eje HPA se activan para afrontar y resolver la emergencia (en cuestión de minutos o en pocas horas), recuperando después la homeostasis. Sin embargo, cuando el organismo es desafiado durante períodos prolongados de tiempo (de semanas a meses), cuando el estresor es de alta intensidad o cuando es expuesto durante

periodos críticos de la vida, la respuesta al estrés se presenta de forma sostenida y permanente. La exposición crónica al estrés durante estadios embrionarios/fetales y neonatales disminuye el crecimiento corporal y la secreción de hormonas sexuales, contribuyendo a menoscabar dichas capacidades (DeNardo y Licht, 1993; Chrousos *et al.*, 1998; Greenberg, 2002; Mulder *et al.*, 2002; Kapoor y Matthews, 2008), pero también puede llegar a “programar” cambios persistentes en diversos sistemas fisiológicos (Brunton, 2013), además de predisponer a trastornos a los organismos (Greenberg y Wingfield, 1987).

En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, el período de incubación dura un promedio de 45 días, pero puede alargarse si hay un decremento en la temperatura (Bézy *et al.*, 2014). El traslado, las condiciones ambientales irregulares asociadas con la incubación en NHH, así como la retención de las crías después de su emergencia podría exponer a los embriones, fetos y neonatos de tortuga a respuestas crónicas al estrés. Dicha exposición crónica al estrés podría contribuir a causar algunos efectos negativos en las crías de los NHH documentados, tales como las inconsistentes y reducidas tasas de eclosión y emergencia (Eckert y Eckert, 1990; Marcovaldi y Laurent, 1996; Rees *et al.*, 2002; Özdemir y Türkozan, 2006; Kiliç y Candan, 2014), precaria salud (Booth y Astill, 2001), desbalances en la proporción de sexos (Mrosovsky e Yntema, 1980; Morreale *et al.*, 1982; Mrosovsky, 2008; Pintus *et al.*, 2009), así como la distorsión del fenotipo de las crías (Reece *et al.*, 2002, Glen *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2007).

Por tanto, en el presente estudio valoramos si las crías de *L. olivacea*, producidas en los viveros de huevos translocados e incubados en NHH, presentan signos morfológicos y funcionales de respuestas crónicas al estrés, en el momento de su emergencia del nido. Así mismo, evaluamos a los neonatos retenidos durante 12 horas. Debido a que el eje HPI en las tortugas comienza a funcionar entre los días 11 y 15 de incubación (estadios embrionarios 7 a 10; Kuntz, 1906; Pearson *et al.*, 1983; Milano, 1991; Jenkins y Porter, 2004) es probable que, para el caso de las crías a la emergencia del nido, nuestros resultados reflejen predominantemente los efectos de las condiciones de incubación en NHH, en lugar de los efectos asociados con la translocación del huevo.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Densidades poblacionales de tortuga marina

En la actualidad, las poblaciones de las diferentes especies de tortugas marinas se encuentran reducidas (Sarti, *et al.*, 2007; Seminoff y Shanker, 2008). En los últimos años, el hombre ha diezmado drásticamente la capacidad de estas especies para mantener su viabilidad, por lo que la mayoría de sus poblaciones se encuentran en declinación, frecuentemente en niveles críticos (Abreu-Groboi y Plotkin, 2008).

Los estudios estiman la disminución de más del 97% (reportando un poco más de 15,000 nidos en 1988 a menos de 1,500 nidos en el 2009) de la población anidadora de tortuga laúd (*D. coriacea*) del Océano Pacífico Oriental (Wallace *et al.*, 2013), por lo que esta especie es considerada en peligro crítico a la extinción en dicha región. Por su parte, la población de tortuga laúd al Noroeste del Océano Atlántico ha mostrado algunos signos de recuperación (reportando 42, 158 nidos durante la década de los 70's a 52, 842 nidos ya para el 2010) y es considerada como preocupación menor por la lista roja para dicha región (Tiwari *et al.*, 2013). En suma, a nivel global se considera como vulnerable a la extinción, categoría que se encuentra dentro del status de amenaza a la extinción (<http://www.iucnredlist.org/details/6494/0>).

La población contemporánea de tortuga carey (*E. imbricata*) anidadora del Océano Pacífico Oriental ha mostrado una recuperación significativa, reportando 27 nidos en el 2007 a 3, 508 nidos para el 2016 (Gaos *et al.*, 2017). En el 2007, dicha población reflejaba una pequeña fracción (2.9 %) respecto de la población histórica (Gaos *et al.*, 2010). Actualmente, la especie permanece en un alto estado precario y permanece en gran parte dependiente de la conservación (<700 individuos. Gaos *et al.*, 2017) en dicha región. Del mismo modo, la población de carey tiende a anidar en bajas densidades (> 500 arrastres por año) al Noroeste del Océano Atlántico (Sartain-Iverson *et al.*, 2016. <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn148/mtn148-2.shtml>). Por lo que es clasificada a nivel global como en peligro crítico a la extinción (<http://www.iucnredlist.org/details/8005/0>).

El estado de muchas poblaciones sigue siendo desconocido. Por lo que aún se requieren muchos esfuerzos para monitorear, sobre todo para mantener tendencias positivas y revertir disminuciones constantes.

4.2 Taxonomía, identidad y abundancia de tortuga golfina

Las tortugas pertenecen al Orden Chelonii, al suborden Cryptodira, de la Clase Reptilia. El nombre genérico de las tortugas golfinas, *Lepidochelys*, fue propuesto en Fitzinger 1843 (Alvarado y Delgado, 2004).

L. olivacea o comúnmente llamada tortuga golfina, es la más pequeña de las tortugas marinas. Esta tortuga en la etapa adulta alcanza un peso menor a los 50 kilogramos y tiene el caparazón casi redondo en región dorsal. En los juveniles el caparazón es suave, pero elevado y algunos tectiforme (en forma de tienda) con los escudos del caparazón ligeramente superpuestos. En adultos y juveniles la cabeza corresponde aproximadamente al 20% de la longitud del caparazón, mientras que la cabeza de las crías es proporcionalmente más grande, correspondiendo al 39%. En general, la cabeza presenta dos pares de escamas pre-frontales y el caparazón tiene cinco escudos centrales, cinco o más pares de escudos laterales y 12 pares de marginales (Fig. 1). 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. En la región dorsal los adultos son de color verde olivo, mientras que el plastrón es blanco amarillento. Las crías son completamente negras, pero aproximadamente a los 10 meses dorsalmente grises, el plastrón se torna casi completamente blanco, con un poro distinto, pequeño, cerca del margen de cada uno de los cuatro escudos infra-marginales (Eckert y Eckert, 1990).

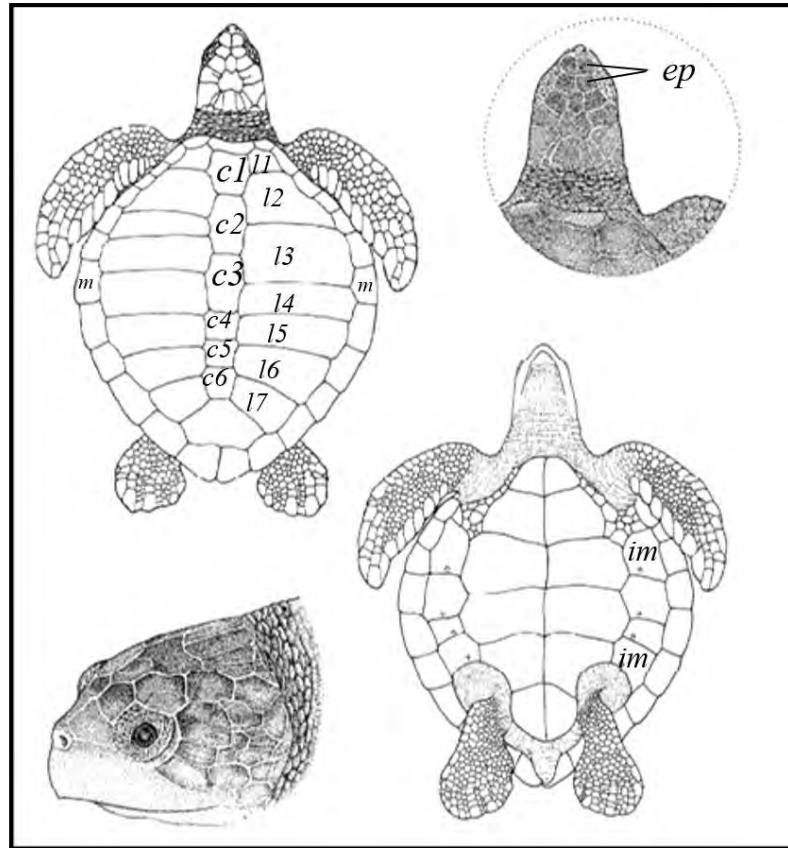


Figura 1. Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*). En adultos el *caparazón* de esta especie es corto y ancho, muy estrecho y alto; presenta de cinco a nueve pares de escudos costales (*c*: usualmente de cinco a ocho), generalmente en una configuración asimétrica; la longitud del caparazón (LC) es de 72 cm. *Cabeza*: relativamente grande, triangular desde arriba; anchura de 13 cm; dos pares de escudos pre frontales (*ep*). *Miembros*: dos garras en cada aleta (algunos adultos pueden perder la garra secundaria de las aletas delanteras). *Coloración*: dorsalmente verde oliva; por debajo (plastrón) amarillo. *Plastrón*: con cuatro escudos infra-marginales (*im*). *Distribución*: agua tropical del Océano Pacífico, indio y Atlántico. *Peso*: de 35 a 50 kilogramos (Modificado de Eckert y Eckert, 1990).

Esta especie habita las aguas tropicales del Pacífico y el Atlántico Central. En el Pacífico Mexicano las colonias anidadoras más grandes han sido registradas en los estados de Oaxaca (La Escobilla, Morro Ayutla y Chacahua), Guerrero (Piedra Tlacoyunque) y Jalisco (Mismaloya- La Gloria). En las playas de Baja California Sur y Colima las anidaciones ocurren en menor medida. En el caso de Michoacán también se ha registrado una afluencia de hembras, destacándose una alta

concentración de anidaciones en playa Ixtapilla, donde se protegen alrededor de 1, 300 nidadas por temporada, desde el 2001 (Alvarado y Delgado, 2004).

El conocimiento de las poblaciones de tortugas marinas es limitado temporal y espacialmente. En los estudios sólo se examina un estadio de vida, en una única comunidad y en un limitado período de tiempo. Sin embargo, las tortugas marinas son organismos longevos y de lento crecimiento que utilizan diversos hábitats a lo largo de su vida. No obstante estas limitaciones, se sabe que en la actualidad la población de tortuga golfina (*L. olivacea*) globalmente se encuentra dentro de la categoría vulnerable (<http://www.iucnredlist.org/details/11534/0>) debido a que ha mostrado una franca recuperación en el Océano Pacífico Oriental (Wallace *et al.*, 2006; 2011), sobre todo gracias a la prohibición de la comercialización de productos de tortuga marina y a la disminución de la captura incidental (Sykora-Bodie *et al.*, 2017). No obstante, se encuentra en alto riesgo y amenaza al Noroeste del Océano Índico (Wallace *et al.*, 2006; 2011). Los conteos de desoves para dicha región han mostrado drásticos decrementos para Malasia (de 250 000 desoves en 1980 a poco menos de 1000 para el año 2000), Myanmar (de 1.5 millones de desoves anuales en 1910 a poco menos de 0.1 millón para el año 2000) y Tailandia (de 300 nidos en los 80's a 30 nidos para los 90's. Shanker, 2004. <http://www.fao.org/docrep/007/y5750e/y5750e05.htm#bm05>).

4.3 Salvaguarda de los huevos, una medida de conservación: Efectos negativos

Los métodos diseñados para promover la recuperación de las empobrecidas poblaciones de tortugas marinas son muchos, pero los más comunes incluyen:

- Preservación del hábitat
- Protección de las hembras grávidas durante la anidación
- Mitigación de la captura incidental
- Intensificación de campañas de concienciación pública
- **La salvaguarda de los huevos, mediante su reubicación a viveros**

La operación de los viveros es una herramienta importante en la conservación de las poblaciones de tortugas marinas a nivel mundial, la cual se ha venido implementando durante décadas. La incubación de los huevos en los NHH se lleva a cabo bajo las condiciones naturales de sustrato (arena) y de luz, pero los requisitos de construcción y personal se implementan al mínimo, de acuerdo a la norma 162 (NOM-162) de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (NOM-162-SEMARNAT-2011:

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5286506&fecha=01/02/2013).

Sin embargo, han sido documentados diversos efectos negativos de la reubicación e incubación de los huevos en los NHH de los viveros entre las que se encuentran:

1. Tasas de eclosión y emergencia de las crías inconsistentes y reducidas. Entre 1961 y 1980 en Malasia, se reportó que el promedio general de la tasa de eclosión para la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) fue del 51.6 % para los nidos “*ex situ*” (NHH), mientras que fue de un 65% para los nidos “*in situ*” (NN. Siow, 1981; Siow y Moll, 1982). En Puerto Rico, la tasa de eclosión “*in situ*” promedio de tortuga laúd fue del 72% (Tucker y Hall, 1984). Eckert y Eckert (1990) determinaron una proporción consistentemente mayor de huevos reventados y neonatos muertos en los NHH del vivero, así como la reducción en la tasa de eclosión, en comparación con los NN (53.7% frente a 64.1%, respectivamente). De modo semejante la tasa de eclosión fue reducida a un 20% en las nidadas “*ex situ*” de *Chelonia mydas* (Pintus *et al.*, 2009) y de *Eretmochelys imbricata* (Garduño-Andrade y Cervantes, 1996). Se propone que la sensibilidad de los huevos al movimiento se puede generar durante el desarrollo embrionario temprano.

Cuando el huevo se ha mantenido estacionario durante un período después de la oviposición, la yema del huevo se eleva, a través de la albúmina, a una posición superior. El embrión de la tortuga se desarrolla en la parte periférica del huevo, justo debajo del cascarón. Tal orientación podría ser crucial para la supervivencia del embrión en desarrollo. La sensibilidad de los embriones a la rotación y agitación causada por la manipulación humana podría ser atribuida al rompimiento de las membranas, que se forman entre las 36 horas y hasta el medio tercio del período de

incubación (de los 17 a los 34 días. Chan *et al.*, 1985), así como a la mortalidad inducida por el movimiento debida que puede evitar la fijación de las membranas embrionarias a la cáscara del huevo y suspender así el desarrollo (Limpus *et al.*, 1979; Parmenter, 1980).

2. Potencial para sesgar la proporción de sexos de las crías. La diferenciación sexual de todas las especies de tortugas marinas está determinada por la temperatura de incubación (Mrosovsky e Yntema, 1980; Morreale *et al.*, 1982; McCoy *et al.*, 1983), fenómeno conocido como determinación del sexo dependiente de la temperatura (TSD, por sus siglas en inglés: temperature dependent sex determination). Las temperaturas de incubación más frías producen crías predominantemente masculinas, mientras que las temperaturas más cálidas producen una gran proporción de hembras (Ewert *et al.*, 1994). No obstante, en una temperatura particular (conocida como temperatura pivotal alrededor de los 29°C) la proporción sexual producida es de 1:1 (Mrosovsky, 1994). La gama de temperaturas de incubación en la que ambos sexos son producidos, conocida también como el intervalo de transición de temperaturas (TRT, por sus siglas en inglés: transitional range of temperature), es a menudo estrecha en tortugas marinas (2° a 3°C. Mrosovsky, 1994). El período termosensible, cuando se determina el sexo, se produce durante el medio tercio (de los 17 a los 34 días) de la incubación embrionaria (Mrosovsky e Yntema, 1982). Teniendo en consideración esto, se sabe también que, durante el desarrollo embrionario, en los nidos se produce progresivamente mayor cantidad de calor metabólico (Godfrey y Mrosovsky, 1997). Este calor, dependiendo de su magnitud y tiempo, puede tener consecuencias en la determinación sexual (Godfrey y Mrosovsky, 1997). Degregorio y Southwood (2011) reportaron que las nidadas de *Caretta caretta* reubicadas en viveros presentaron mayores temperaturas ($30.4^{\circ} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) frente a las de nidos *in situ* ($29.4^{\circ} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$) y por tanto los nidos reubicados requirieron menor período de incubación (53.0 ± 0.8 días) respecto de los nidos *in situ* (57.0 ± 1.0 días, $*p=0.01$).

3. Aumento del riesgo de deformidad embrionaria. Diversos estudios han reportado que el manejo de los huevos durante la fase de desarrollo embrionario genera tanto una menor masa corporal como variaciones en el número de los escudos de *L. olivacea* (Hill, 1971; Mast y Carr, 1989), *C. mydas* (Sonmez *et al.*, 2011) y *C. caretta* (Turkozán *et al.*, 2013). Adicionalmente, las

crías de *C. mydas* provenientes de NHH presentaron extremidades anteriores más pequeñas y menor longitud corporal respecto de las crías de los NN (Sonmez *et al.*, 2011). Por tanto, la incubación en NHH tiene un efecto negativo sobre el tamaño y morfología de las crías reduciendo su aptitud (capacidad de realizar adecuadamente el desplazamiento en tierra y en mar. Hill, 1971, Whitmore y Dutton, 1985; Sonmez *et al.*, 2011).

4. Ambiente de incubación empobrecido. Como se ha descrito previamente, los NHH presentan temperaturas de incubación más elevadas que aquéllas registradas en los NN durante el segundo y tercer tercio del período de incubación (entre los días 21 al 42 días de incubación. De Gregorio y Southwood, 2011; Dunbar *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha reportado que los NHH presentan un porcentaje de humedad disminuido ($40 \pm 7.6\%$) con respecto a los NN ($46.6 \pm 8.55\%$). A su vez, en los NHH se encontró una mayor proporción de granos de arena finos (53%), mientras que en los NN existe una tendencia a encontrar granos de arena de mayor tamaño (59%, escala Wentworth). El mayor tamaño del grano de la arena permite una mejor distribución del oxígeno entre los espacios intersticiales y los embriones (Arzola-González, 2007). En conjunto, estas características favorecen que los huevos incubados en NHH eclosionen más rápidamente (53 ± 0.8 días) que sus contrapartes incubados en NN (57 ± 1.0 días. De Gregorio y Southwood, 2011).

A su vez, ha sido documentada la presencia de especies de hongos y bacterias en huevos de tortugas marinas en arribadas (Bézy *et al.*, 2014) y en los expuestos a sustratos de criadero usados previamente o a cáscaras de huevo en descomposición, sobre todo durante el primer y medio tercio del desarrollo embrionario. Estos microorganismos (*Fusarium solani*, *F. oxiporum*, *Acinetobacter lwoffii*, *A. baumannii*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brevundimonas vesicularis* and, *Corinebacterium acuaticum* y *Pseudomonas stutzeri*) produjeron neonatos más pequeños y / o que pesaban menos que los control y un aumento de riesgo de contaminación (Patino-Martínez *et al.*, 2012). Como se ha mencionado, la elevada densidad de nidos (Shanker *et al.*, 2003; Ozdemir y Turkozan, 2006) afecta la calidad del sustrato de incubación, incluyendo un aumento en la materia

orgánica y microorganismos presentes en la arena (Clusella-Trullas y Paladino, 2007; Patino-Martínez *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que se desconoce si las infecciones por hongos y bacterias colonizan huevos en desarrollo, o crecen en los que ya están muertos, e incluso se desconocen aún los mecanismos subyacentes a dicho riesgo (Patino-Martínez *et al.*, 2012; Phillot *et al.*, 2006; 2011). Para evitar la acumulación de microorganismos en el nido y la disminución del riesgo de infección del huevo, es recomendable el uso de diferentes sitios de incubación por temporada (Shanker *et al.*, 2003). No obstante, ello implicaría mudanza de las instalaciones e infraestructura cada año, lo cual resulta costoso, complejo e inviable (Patino-Martínez *et al.*, 2012). En Michoacán, esto es raramente implementado.

Otras prácticas frecuentes en los viveros son:

La retención de las crías emergentes durante varias horas (Hewavisenthi, 2001), lo cual puede provocar lesiones o también letargo para comportarse frenéticamente al entrar al mar. De hecho, se ha reportado que el vigor disminuyó progresivamente cuando las crías se retuvieron en el criadero durante 1, 3 y 6 horas después de la emergencia (Van de Merwe *et al.*, 2013; Dunbar *et al.*, 2015). Este aletargamiento es totalmente opuesto a su comportamiento natural, conocido como “frenesí natatorio”, el cual comienza en la ruptura del cascarón y se extiende a la excavación del nido, la salida a la superficie del mismo y dura por lo menos un día más cuando llegan a mar abierto. Esta es una estrategia utilizada por los neonatos para que puedan moverse desde el nido hacia el mar en cuestión de minutos, lo que a su vez reduce significativamente la oportunidad de ser depredadas.

La liberación de crías de vivero realizadas en el mismo sitio cada día, crean estaciones de alimentación para peces y aves marinas y a su vez, conducen a altas tasas de mortalidad, ya sea mientras están en la playa o en el mar (Van de Merwe *et al.*, 2013).

En resumen, a pesar de que la reubicación de organismos en los NHH es una práctica de protección importante, tiene diversos efectos negativos que podrían afectar la viabilidad de las crías debido a que podrían someter a los embriones/ fetos y neonatos a fuertes retos mecánicos (Chan *et al.*, 1985; Van de Merwe *et al.*, 2013), térmicos (Booth and Astill, 2001; Arzola-González, 2007; Tuttle y Rostal, 2010; DeGregorio y Southwood, 2011) y microbiológicos (Patino-Martínez *et al.*, 2012) que eventualmente podrían generar respuestas por una exposición crónica al estrés, hipótesis que hasta antes de este trabajo no había sido analizada.

4.4 Estrés y activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal

El estrés es definido como un estado de desarmonía y amenaza a la homeostasis (mantenimiento complejo dinámico y armonioso equilibrio fisiológico) del organismo, el cual es contrarrestado por una serie de respuestas fisiológicas, que en colectivo tienen el propósito de restablecer el equilibrio, lo que se conoce como respuestas al estrés (Chrousos, 1992). La activación de las respuestas al estrés conduce a una serie de cambios o alteraciones a nivel fisiológico, entre otros, que alertan al organismo de cambios en los ambientes interno y/o externo, de modo que facilitan la habilidad del organismo para ajustar su homeostasis e incrementar su oportunidad de supervivencia (Tsigos y Chrousos, 2002). Al aumentar la atención, el cerebro se enfoca sobre la amenaza, se aceleran el ritmo cardiaco y la respiración, se incrementa el metabolismo de glucosa y de proteínas, el flujo sanguíneo se redirige para proveer al máximo de combustible disponible al cerebro, al corazón y a los músculos (Chrousos y Gold, 1992). Estos patrones de respuesta al estrés pueden ser, específicos al estresor (agente que induce el estrés) o generalizados o no específicos. Además, pueden ser estereotípicos (hiporreactiva o hiperreactiva), lo que ocurre generalmente si la magnitud (tiempo o intensidad) de la amenaza a la homeostasis excede el umbral de tolerancia del sistema estrés propio del organismo (Chrousos, 1992).

Las respuestas al estrés descritas ampliamente en vertebrados son: respuestas de lucha o de huida modulada por la vía simpático-medular (SAM, por sus siglas en inglés: sympathomedullary pathway) y la activación del eje HPA. Así, cuando el sistema nervioso central percibe un estímulo

como estresor, se genera la activación de dicho eje, iniciada por un conjunto de neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular medial del hipotálamo (mpPVN, por sus siglas en inglés: medial parvocellular paraventricular nucleus). Estas neuronas sintetizan y secretan altas concentraciones de CRH, la cual, controla, estimula y promueve la secreción de la hormona ACTH desde la hipófisis anterior (o adenohipófisis) hacia la circulación sistémica. A su vez, promueve la síntesis y liberación de los GC de la zona fasciculada de la corteza de las glándulas adrenales hacia el torrente sanguíneo. Los GC son por tanto, las hormonas efectoras finales de la respuesta al estrés (Fig. 2).

Adicionalmente, a través de un mecanismo de retro-alimentación negativa, los GC actúan a través de sus receptores inhibiendo la respuesta secretora de ACTH, para limitar la duración de la exposición de los tejidos susceptibles a los GC, minimizando los efectos de dichas hormonas. De modo semejante, los GC actúan inhibiendo la secreción de CRH y vasopresina (AVP, por sus siglas en inglés: arginine vasopressin) a nivel del mpPVN.

Sin embargo, es importante hacer notar que en ratas que carecen de la señalización de la retroalimentación negativa (subsecuente a la adrenalectomía) pueden inhibir las respuestas de ACTH, indicando que existen otros mecanismos que regulan la secreción de ACTH en ausencia de la retroalimentación negativa por parte de los GC (Jacobson *et al.*, 1988). Este hallazgo evidencia una regulación central sobre el eje HPA. Otras regiones cerebrales también ejercen una retroalimentación negativa sobre la activación del eje HPA, tales como el hipocampo (aunque este no es exclusivo de apagar la respuesta del eje HPA, existen otras regiones cerebrales con la función de apagado, ver tema 4.5).

Cabe considerarse que el principal GC en humanos, en la mayoría de los mamíferos y en los peces es el cortisol o hidrocortisona (Matteri *et al.*, 2000), aunque también se libera pero en menor proporción la corticosterona para dichos grupos de organismos; mientras que el GC más importante en roedores, reptiles, anfibios y aves es la corticosterona; aunque también se secreta en menor medida el cortisol (Stratakis y Chrousos, 1995; Romero, 2004).

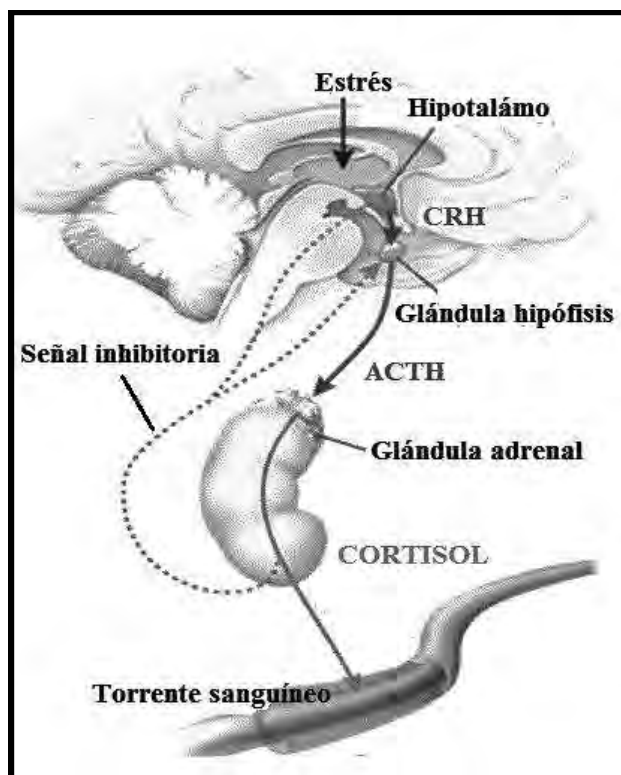


Figura 2. Representación esquemática del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal en vertebrados. El estímulo externo percibido como estresor inicia una cascada de eventos, los cuales generan la activación del sistema nervioso y la secreción aumentada del factor de liberación de la hormona corticotrófica (CRH) y vasopresina (AVP) de las neuronas del hipotálamo. La activación simpática inicia la liberación de catecolaminas de la médula adrenal, las cuales actúan sobre varios órganos y tejidos blancos. A su vez, la CRH y la AVP estimulan un aumento en la secreción y liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) de la glándula hipofísis anterior, la cual estimula la secreción y liberación de glucocorticoides (GC) de la zona fasciculada de la corteza de la glándula adrenal. Los GC, como el cortisol, actúan en una gran variedad de tejidos y órganos blancos, con la finalidad de que los organismos recuperen la homeostasis (Matteri *et al.*, 2000. Imagen modificada de <https://a3nutricion.wordpress.com/tag/eje-hpa/>). CRH, péptido de 41 aminoácidos que fue aislado por vez primera en 1981 por W. Vale. Es el principal estímulo hipotalámico del eje Hipofisiario-Adrenal. AVP (Hormona arginina vasopresina o argipresina, ó AVP, por sus siglas en inglés: arginine vasopressin), también conocida como la hormona antidiurética (HAD o por sus siglas en inglés ADH: antidiuretic hormone), es un oligopéptido constituido por nueve aminoácidos.

Los cambios en los niveles plasmáticos de GC son ampliamente utilizados como indicadores de activación de la respuesta neuroendocrina al estrés (Donaldson, 1981; Pottinger y Carrick, 2000;

Schreck *et al.*, 2001; McEwen y Wingfield, 2003). Se asume que la amplitud de la respuesta hormonal se correlaciona con la salud general de un animal (Chrousos y Gold, 1992) y, por extensión, con la salud de la población (Romero, 2004). En general, niveles basales (iniciales al estímulo de estrés, fig. 3) mayores en el tiempo son indicativos de la peor condición del individuo o población. En este contexto, las alteraciones en la secreción de glucocorticoides sugieren una disfunción del eje HPA (Herman *et al.*, 2005). Dicha disfunción puede generar la resistencia a la retroalimentación negativa y episodios de hipersecreción (Fig. 3a). Por el contrario, hay casos en los que se exhiben niveles de corticosterona basales disminuidos y respuestas inhibidas al estrés (Fig. 3b). En ambos casos, han sido observadas afectaciones en la función cognitiva, además de otras alteraciones. Tomados en conjunto, estos hallazgos reflejan la importancia de un buen funcionamiento del eje HPA y respuestas óptimas en los niveles de corticosterona (Chrousos y Gold, 1992).

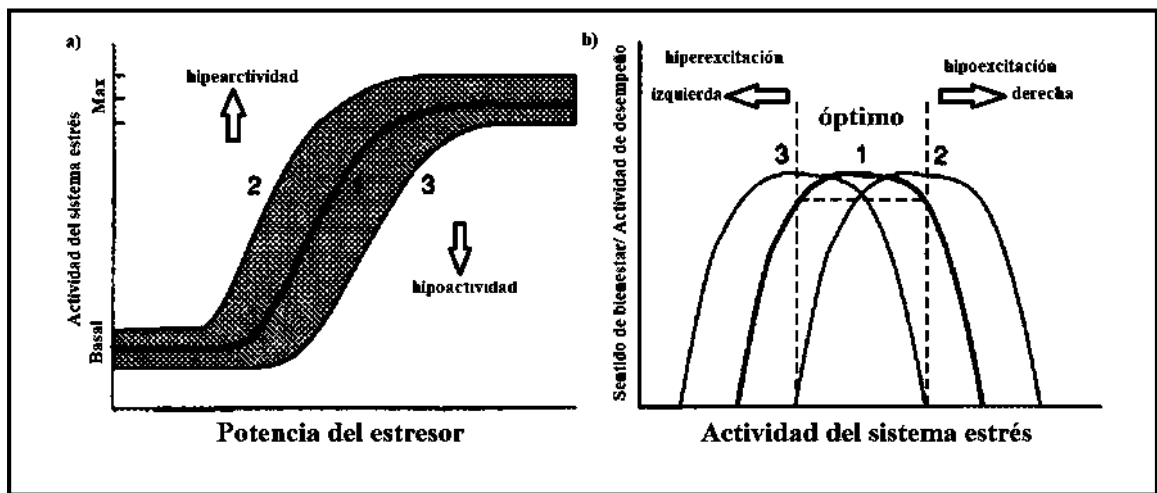


Figura 3.- Curvas de niveles de respuestas entre la potencia de un estresor impuesto y la actividad de los componentes del sistema de estrés que responden al mismo. a) Curva 1 (línea negra intenso): la curva dosis-respuesta normal. Curva 2: la curva dosis-respuesta que define el nivel fisiológico superior de la actividad del sistema de estrés. Curva 3: la curva dosis-respuesta que define el nivel fisiológico más bajo de la actividad del sistema de estrés. Cualquier curva más alta que la curva 2 representa la hiperactividad del sistema de estrés, mientras que cualquier curva inferior a la curva 3 representa la hipoactividad del sistema de estrés. b) La curva de dosis-respuesta en forma de U invertida entre la sensación de bienestar o la capacidad de rendimiento y la actividad del sistema de estrés. Curva 1 (línea color negro intenso): curva de actividad óptima del sistema de estrés. Curva 2: curva de actividad excesiva del sistema de estrés. Curva 3: curva de actividad del sistema de tensión defectuosa. Las curvas 2 y 3 acortan la parte

superior de la curva óptima y representan desplazamientos hacia la derecha (hiperactividad/ansiedad) y hacia la izquierda (hipoactividad), respectivamente, mientras que ambas se asocian con una sensación de bienestar por debajo de lo normal o una disminución del rendimiento (Adaptado de Chrousos. y Gold, 1992).

No obstante, en algunos otros casos la relación entre la exposición a estímulos crónicos estresantes y los niveles séricos de GC, no siempre resultan consistentes, debido a que en una gran cantidad de estudios realizados en las diversas especies no se reportan variaciones significativas (Bonier *et al.*, 2009). Por ello, Romero (2004) propone que para interpretar de manera correcta los niveles de GC, los estudios deben considerar otros factores, como por ejemplo: los mecanismos que regulan la liberación hormonal durante el estrés, los eventos tempranos y su repercusión sobre las respuestas del adulto, la fisiología del estrés ante eventos repetidos y crónicos, así como la retroalimentación negativa y el término de la respuesta al estrés.

Dada la relación que existe entre las respuestas al estrés generadas por la exposición crónica y desórdenes en las funciones cognitivas, es importante hacer notar la función del hipocampo, quien está implicado en la regulación inhibitoria del eje HPA (aunque no es exclusiva).

4.5 Control central del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal

4.5.1 Hipocampo

En mamíferos el hipocampo es una estructura cerebral implicada en la codificación, almacenamiento y recuperación de la información, fenómenos denominados como aprendizaje y memoria (Fedulov *et al.*, 2007). Esta estructura presenta los niveles más elevados de receptores a GC (GR, por sus siglas en inglés: glucocorticoid receptors) y de receptores a mineralocorticoides (MR por sus siglas en inglés: mineralocorticoid receptors) que cualquier otra parte del cerebro, sugiriendo un alto nivel de receptividad para dichas hormonas (Fuxe *et al.*, 1985; Arriza *et al.*, 1998). De modo que, dicha receptividad permite a esta región cerebral regular el funcionamiento del eje HPA de manera vital. Ratones con eliminación selectiva de GRs del hipocampo, presentan

niveles de glucocorticoides basales elevados y respuestas prolongadas de corticosterona al estrés psicogénico (Boyle, 2005).

Diversos estudios evidencian una retro-alimentación negativa sobre el eje HPA por parte del hipocampo; la hipocampectomía o la lesión excito-tóxica (destrucción o degeneración de neuronas por las sobre activaciones de receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato) del hipocampo produce incrementos en la liberación de corticosterona, de ACTH, así como en los niveles del mRNA de CRH y/o AVP, en las neuronas parvocelulares y/o magnocelulares del núcleo *peraventricularis* del hipotálamo (PVN, por sus siglas en inglés: paraventricular nucleus) respectivamente (Herman, 1989; 1992; 1995). Dosis farmacológicas de corticosterona y/o exposición crónica al estrés (social, retención, separación maternal, etc.) se asocian a la alteración o remodelación de las neuronas del hipocampo y al decremento de la expresión de los GRs (Margariños *et al.*, 1996; 1998; Vyas *et al.*, 2002). Dichos estudios han destacado que la función del hipocampo sobre la regulación del eje HPA es inhibir su activación (Jacobson y Sapolsky, 1991; Herman *et al.*, 2003). Sin embargo, es bien conocido en roedores que los niveles de regulación del hipocampo sobre el eje HPA resulta específica tanto del estresor y del tipo de lesión o estimulación (Herman *et al.*, 2005).

El hipocampo carece de proyecciones eferentes que lleguen directamente al PVN. No obstante, envía proyecciones hacia la población celular del tronco encefálico, por ejemplo, mediante el *subiculum ventral* (*vSUB*, por sus siglas en inglés: *ventral subiculum*) que proyecta hacia el núcleo del lecho de la estría terminal (BST, por sus siglas en inglés: bed nucleus of the stria *terminalis*), y ésta directamente inerva a la población de neuronas parvo-celulares del PVN, el cual es abundantemente inervado por proyecciones GABAérgicas (por sus siglas en inglés: gamma-Aminobutyric acid) desde diversas regiones cerebrales (Fig. 4. Ulrich-Lai y Herman, 2009; Radley y Sawchenko, 2011). De modo que, la influencia de las distintas regiones cerebrales sobre la activación del eje HPA probablemente determinen el resultado final del patrón de las respuestas a estímulos dados y la magnitud de la respuesta secretora (Herman *et al.*, 2005).

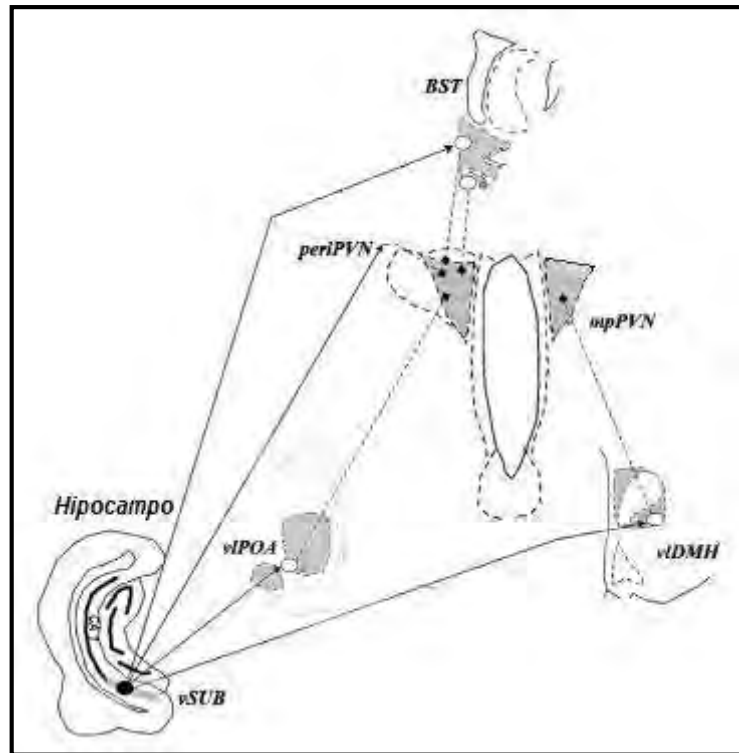


Figura 4. Representación esquemática de las proyecciones hipocámpicas en las respuestas al estrés. El hipocampo envía proyecciones hacia el *subiculum* ventral (vSUB) y éste a su vez envía proyecciones excitadoras (designadas como círculos oscuros, línea de flecha sólida) a numerosas regiones subcorticales, como lo son, al núcleo del lecho de la estría terminal (BST) posterior, al núcleo periparaventricular (peri-PVN), la región ventrolateral del núcleo del área preóptica medial (vIPOA) y la región ventrolateral del núcleo hipotalámico dorsomedial (vDMH), todos los cuales envían proyecciones GABAérgicas (delineado como círculos abiertos, líneas punteadas que terminan en cuadrados) al PVN, comunicando una inhibición trans-sináptica (Modificado de Herman *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que respecto al control central sobre las respuestas al estrés no se sabe nada para las tortugas marinas y reptiles en general, por lo que desarrollar este tema, aportará mucha información al campo. El hipocampo no es una región conservada en los reptiles. Sin embargo, diversos estudios sugieren que las áreas denominadas como corteza medial, dorso-medial, dorsal y lateral de cerebros de reptiles podrían constituir regiones homólogas al hipocampo de mamíferos (Ariens, 1929; Elliot, 1910; Johnston, 1913; Ulinsky, 1990; Reiner, 1993; Shen y Kriegstein, 1986; Medina y Reiner, 2000; Dugas-Ford *et al.*, 2012; Naumann *et al.*, 2015). El estudio de la capacidad

inhibitoria de estas cortezas sobre el eje HPI de los reptiles, podría sugerir una similitud desde un nivel fisiológico.

4.5.2 Corteza dorsal y dorso-medial de reptiles y su homología con el hipocampo

Para el caso de tortugas terrestres, las cortezas dorsal (DC, por sus siglas en inglés: dorsal cortex) y dorsomedial (DMC, por sus siglas en inglés: dorsomedial cortex) son consideradas como homólogas a las regiones CA2 y CA3 (por sus siglas en inglés: cortical área) del hipocampo de los mamíferos debido a las siguientes homologías: i) posición similar en el circuito cortical (Reiner, 1993. Fig. 5); ii) citología común (Fig. 6 y 7), iii) un patrón común de conexiones con otras áreas (Ulinsky, 1990. Fig. 7) y iv) ambas presentan una ontogénesis tardía en el desarrollo embrionario (Elliot, 1910; Johnston, 1913; Ariens, 1929).

i) Posición en el circuito cortical

En los reptiles, las regiones DC y DMC se ubican medial al ventrículo lateral, formando la pared telencéflica medial (Reiner, 1993. Fig. 5), correspondiente con el hipocampo de mamíferos (Aboitiz y Zamorano, 2013).

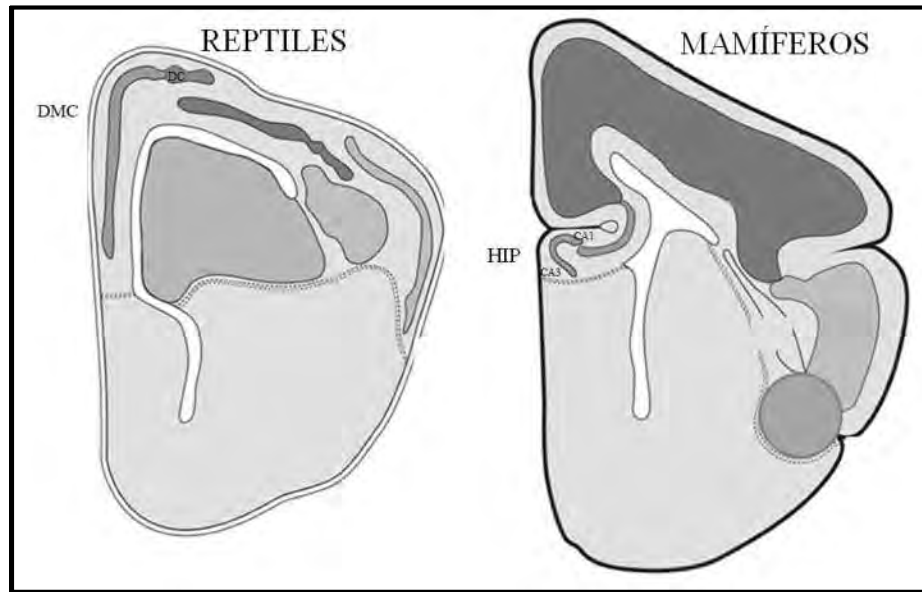


Figura 5. Esquema representando los hemisferios cerebrales de reptiles y mamíferos. El *pallium* (el "techo" del hemisferio cerebral o el telencéfalo: toda la porción por arriba de las líneas dobles punteadas) de reptiles presenta estructuras como la corteza dorsomedial (DMC, por sus siglas en inglés: dorsomedial cortex) correspondiente al hipocampo (HIP) de mamíferos, entre otras regiones (Modificado de Aboitiz y Zamorano, 2013). Corteza dorsal (DC, por sus siglas en inglés: dorsal cortex).

ii) Citología

Con base en preparaciones de Golgi, las regiones DC y DMC contienen dos clases principales de neuronas, las células piramidales y las neuronas estelares, muy semejantes a las neuronas de la corteza de mamíferos (Fig. 6).

Las neuronas piramidales se sitúan en la capa celular, y presentan varias dendritas apicales espinosas que se extienden verticalmente dentro de la capa molecular y hasta la superficie pial (es la membrana más próxima al tejido nervioso) o meninge (Geneser, 2007). Estas neuronas contienen diversas dendritas basilares dirigidas a la capa subcelular, a través del borde de células endodiales o epéndimo (epitelio cúbico simple que recubre la superficie interna de los ventrículos cerebrales (Geneser, 2007). Las neuronas piramidales están moderadamente cubiertas de espinas. El soma de

estas células es de talla mediana, de forma fusiforme a oval, que se distingue ultraestructuralmente por un número grande de lisosomas (Fig. 6. Ariens *et al.*, 1936; Northcutt, 1981; Ulinsky, 1990).

Las neuronas estelares están situadas en la capa subcelular y molecular (Fig. 6). Estas células tienen un soma relativamente pequeño, de forma que va de oval a circular y presentan dendritas orientadas verticalmente y/o que irradian en un campo dendrítico esférico, confinado dentro de una capa cortical dada (ya sea hacia la capa molecular o a la capa subcelular). Estas células presentan dendritas espinosas (Fig. 6. Ulinsky, 1990; Reiner, 1991).

Con base en su organización, las neuronas piramidales son consideradas las principales neuronas de entrada y de salida de la corteza de la tortuga, mientras que las neuronas estelares parecen estar implicadas en las interacciones de circuitos locales (Ariens *et al.*, 1936; Northcutt, 1981; Ulinsky, 1990; Reiner, 1991). La capa de células piramidales de las regiones DC y DMC de la tortuga de orejas rojas (*Pseudemys scripta elegans*) tienen una apariencia dispersa (Ulinsky, 1990) semejante a la subregión CA3 del hipocampo de mamíferos (Desan, 1984).

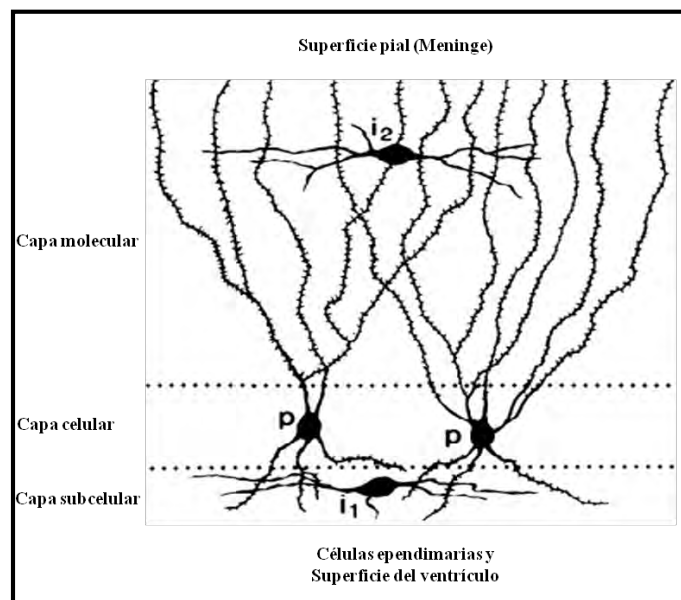


Figura 6. Representación esquemática que muestra los principales tipos neuronales y la organización trilaminar de la corteza dorsal de la tortuga. La corteza dorsal está bordeada por una

superficie pial (meninge) y una capa de células endodiales que recubren el ventrículo. La capa de células piramidales (capa celular) contiene el soma de las neuronas piramidales (p). Las dendritas ascendentes largas de estas neuronas se convierten en espinosas cuando salen de la capa celular y se extienden a través de la capa molecular, hacia la superficie pial. Por su parte, las dendritas basales descienden hacia la zona subcelular. Las neuronas estelares espinosas se encuentran principalmente en las capas subcelular (i_1) y molecular (i_2); sus dendritas a menudo se orientan de forma vertical (Modificado de Shen y Kriegstein, 1986).

iii) Patrón de conexiones

Los patrones de las conexiones aferentes y eferentes en las regiones DC y DMC del reptil (Reiner y Powers, 1983; Ulinsky, 1990) también comparten características con el hipocampo de los mamíferos (Northcutt, 1981; Medina y Reiner, 2000; Dugas-Ford *et al.*, 2012; Naumann *et al.*, 2015). Por ejemplo, la región DC de la mayoría de los reptiles se asemeja al menos a la parte superior del neocortex (NC) de los mamíferos (Fig. 7) la cual, se encuentra situada lateral a las regiones del *pallium* (que en los reptiles incluye la vertiente dorsal ventricular o DVR, por sus siglas en inglés: dorsal ventricular ridge y la corteza lateral u olfativa; Reiner y Powers, 1983; Reinier, 1993. Fig. 5). Sin embargo, una pequeña región de transición, llamada el engrosamiento pallial (o PT, por sus siglas en inglés: pallial thickening) está presente entre la DC y la DVR (Reinier y Northcutt, 2000). Esta región es considerada por diversos autores como una parte lateral de la DC, porque parece ser citológicamente continuo con esta región. A su vez, en el caso de mamíferos, la capa neocortical 4 de la DC (también llamada capa granular, debido a sus células en forma de estrella), generalmente recibe una entrada del tálamo dorsal. Dicho patrón de organización se aplica a la neocorteza (NC, fig.7. Reiner y Powers, 1983; Reinier, 1993; Naumann *et al.*, 2015). En dicha capa, los axones talámicos (fig. 7) entran en contacto con las células estrelladas, así como las dendritas apicales de neuronas piramidales ubicadas en capas infragranulares (capas 5 y 6). Algunos axones talámicos también alcanzan las capas 6 o 1. Las capas infragranulares contienen grandes neuronas piramidales con dendritas apicales que abarcan radialmente las capas superiores y dan lugar a proyecciones descendentes al cuerpo estriado, tálamo y tallo cerebral. Las capas supragranulares contienen neuronas piramidales pequeñas a medianas involucradas en conexiones corticocorticales (asociacionales). Esta organización anatómica y celular, con dendritas orientadas radialmente, que abarcan la mayoría de las capas, constituye una

de las bases de la organización columnar funcional de la neocorteza (Shinoda y Sugihara, 2013; De La Rosa-Prieto *et al.*, 2015). En contraste, la DC reptiliana es más simple, pero se asemeja, de forma muy rudimentaria, a la organización laminar de la neocorteza. La DC reptiliana contiene una subdivisión medial que muestra una capa de tres laminas estructurales, con una capa principal (o capa celular) de células localizada entre la capa superficial (o capa molecular) y profunda (o capa subcelular) con células dispersas (Desan, 1984; Shen y Kriegstein, 1986; Ulinsky, 1990). La capa principal contiene neuronas piramidales con dendritas apicales que abarcan la capa superficial (o capa celular), donde son contactados por los axones talámicos entrantes, al promover sus neuronas piramidales, las cuales dan lugar a proyecciones descendentes hacia el cuerpo estriado, el tálamo y el tronco encefálico. Este laminado básico y la organización celular se asemeja parcialmente a la de la neocorteza (Ulinsky, 1990), con neuronas piramidales ubicadas en capas más profundas (5/6) que dan lugar a largas proyecciones descendentes y axones talámicos que entran en contacto con las dendritas apicales de estas células (Medina y Reiner, 2000; Medina *et al.*, 2017).

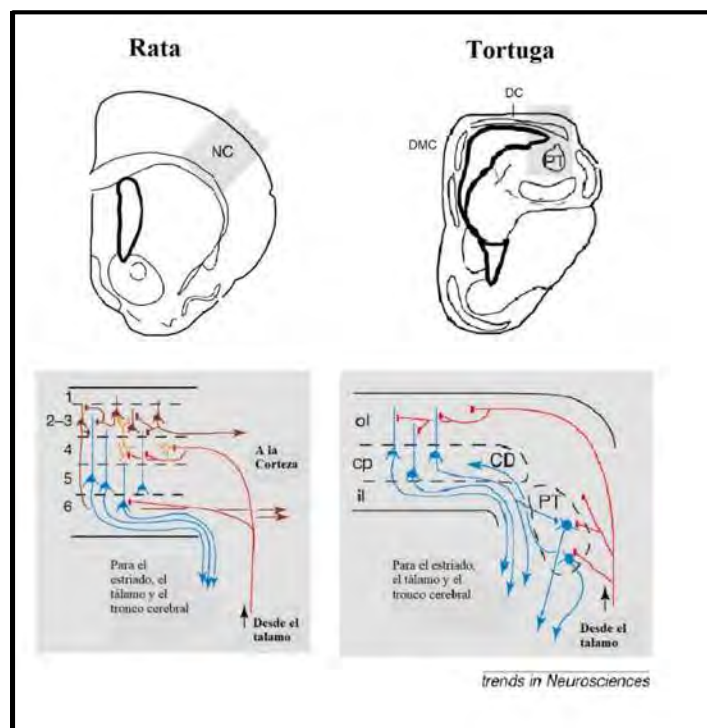


Figura 7. Esquema de las capas / subdivisiones, tipos de células y conexiones principales de la neocorteza de mamíferos y la corteza dorsal reptiliana. La neocorteza de mamíferos muestra una

organización de seis capas, con tipos de células específicos y conexiones. En contraste, la corteza dorsal del reptil es más simple, pero se asemeja de forma muy rudimentaria, a la organización laminar de la neocorteza. La corteza dorsal reptiliana es una capa de tres láminas estructurales, con una capa principal de células localizada entre las capas superficial y profunda, con células dispersas. Dicho laminado básico y la organización celular es parcialmente semejante a la de la neocorteza, con neuronas piramidales ubicadas en las capas 5/6. Capa de células principal (o capa celular, cp, sus siglas en inglés: main cell layer); corteza dorsal reptiliana (DC, por sus siglas en inglés: dorsal cortex); capa interna (il, por sus siglas en inglés: inner layer); capa externa (ol, por sus siglas en inglés: outer layer); engrosamiento paliar (PT, por sus siglas en inglés: pallial thickening); materia blanca (wm, por sus siglas en inglés: white matter. Modificado de Medina y Reiner, 2000).

Algunas otras evidencias que apoyan lo anteriormente descrito, provienen de datos fisiológicos, los cuales concuerdan con los informes anatómicos, destacando una gran gama de similitudes entre las regiones DC y DMC de los reptiles con el hipocampo de los mamíferos (Connor y Kriegstein, 1986). En reptiles incluida la tortuga, el patrón completo de las aferencias desde la estructura DC han sido estudiadas mediante el uso de transporte retrógrado de la enzima peroxidasa de rábano (Por sus siglas en inglés HRP: horseradish peroxidase). Dichos estudios indican que ésta recibe entradas de una variedad considerable de estructuras subcorticales, las cuales pueden agruparse en tres categorías: 1) recursos de información sensorial: sistema olfatorio, núcleo geniculado lateral dorsal y la DVR. 2) estructuras relacionadas al sistema límbico: la DMC recibe proyecciones desde el área pre-óptica y el PVN, así como de los núcleos ipsilateral mamilar, así como del peri-rotundo, del *septum* talámico. 3) tronco encefálico y el sistema basal del cerebro anterior: *locus coeruleus*, núcleos del raphe, formación reticular, cerebro anterior basal. No obstante, la DMC carece de proyecciones eferentes hacia los dos hemisferios, por lo que se sugiere que juega un papel en la interconexión de las áreas corticales. Sus conexiones más obvias forman el mayor sistema comisural en la corteza, uniendo las áreas dorsomediales de un lado del cerebro con el hemisferio contralateral, así como una conexión recíproca con la corteza medial (MC por sus siglas en inglés: Medial cortex. Ulinsky, 1990).

Más aún, las neuronas con el soma en la capa celular, tanto de la DC y DMC se tiñen positivamente con anticuerpos dirigidos hacia el aminoácido excitatorio glutamato (Blanton *et al.*, 1987) y péptidos miembros de la familia de las encefalinas (Reiner, 1983; Reiner, *et al.*, 1984) semejante a lo que se reporta para mamíferos (Aboitiz y Zamorano, 2013).

Aunado a lo anterior, mediante el uso de anticuerpos dirigidos a GABA y a sus enzimas sintéticas (descarboxilasas del ácido glutámico, GAD, por sus siglas en inglés: glutamic acid decarboxylase), así como mediante procedimientos histo-químicos para la enzima que lo metaboliza, GABA-transaminasa, fueron estudiados los patrones de distribución de las neuronas GABAérgicas. Dichas marcas estuvieron presentes en muchas neuronas en las capas: molecular y subcelular, pero muy escasas en la capa celular. Las marcas estuvieron presentes en las neuronas estelares, pero en ninguna célula piramidal (Blanton *et al.*, 1987; Reiner 1993), de manera similar a lo que ocurre en los mamíferos (Aboitiz y Zamorano, 2013).

iv) Ontogénesis

Respecto de las semejanzas en la histogénesis de las áreas corticales en reptiles (por ej. DMC) estudios previos muestran que en el galápago europeo (*Emys orbicularis*) dichas regiones surgen dentro de un período muy corto de tiempo (entre los 8 y 9 días de incubación, correspondientes a los estadios de desarrollo 15-18) y en lagarto verde (*Lacerta trilineata*) entre los 12 y 14 días de incubación (correspondientes a los estadios 32-34. Goffinet, 1983). Algunas estructuras del hipocampo de ratón, por ej. el giro dentado (DG, por sus siglas en inglés: dentate gyrus) comienza a desarrollarse desde un período temprano de desarrollo, el cual se extiende desde el día de incubación 13 (estadio 6) al día posnatal 15 (Yu *et al.*, 2014) por lo que al parecer el inicio de la formación de dichas estructuras es muy semejante a lo ocurrido en reptiles.

Sumado a lo anterior, estudios comparativos en diversas especies de saurópsidos han revelado gradientes tangenciales de histogénesis comparables a los de los mamíferos (Goffinet, 1983; Tuorto *et al.*, 2003; Métin *et al.*, 2006).

4.6 Exposición crónica al estrés y sus efectos sobre el hipocampo

La exposición crónica al estrés puede activar permanentemente la respuesta del eje HPA, generando una elevación exacerbada de GC, que le impiden al organismo recuperar la homeostasis

(Richardson, 2006). Durante la exposición crónica al estrés se altera significativamente la expresión de factores neurotróficos que intervienen en el desarrollo de las células del sistema nervioso (Boyle, 2013), así como de los sistemas de neurotransmisión, generando modificaciones en la cito-arquitectura de determinados núcleos cerebrales (Maguire, 2014).

Por ejemplo, en ratas, la exposición aguda (durante minutos u horas) al estrés aumentó la densidad de espinas de las neuronas piramidales de la región CA1, mientras que la exposición crónica o severa (durante días, semanas o meses) mostró lo contrario (Shors *et al.*, 2001). En apoyo a dichos resultados, Morales-Medina *et al.* (2009) reportan una disminución en el número de espinas, la arborización y la longitud dendrítica en las neuronas de la región CA1 del hipocampo, tras un tratamiento continuo y prolongado de corticosterona. No obstante, una sola o varias administraciones farmacológicas de corticosterona generan una disminución en la densidad de las dendritas de las neuronas piramidales de CA1 (Hajszan *et al.*, 2008; Alfarez *et al.*, 2009). Así mismo, escasos niveles de cuidado maternal resultan en atrofia dendrítica de las neuronas piramidales en CA1 del hipocampo (Champagne *et al.*, 2008). De la misma forma, la exposición crónica al estrés por inmovilización también causó un decremento significativo en la longitud y densidad de las dendritas en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de rata.

Se ha establecido que las neuronas de la región CA3 del hipocampo son más sensibles al tratamiento con ciertas concentraciones farmacológicas de corticosterona (estrategia que podría simular la activación del eje HPA en respuesta a un estresor) en comparación a las del área CA1 (Magariños *et al.*, 1996; 1998). De manera interesante, las neuronas de CA3 pueden enviar sus proyecciones a las dendritas apicales o basales de las neuronas piramidales de CA1 (Hajszan *et al.*, 2008), haciendo más de 20,000 sinapsis (Shors *et al.*, 2001). De hecho, la disminución en la densidad dendrítica en CA3, puede producir la pérdida de axones que realizan las conexiones sinápticas con las espinas de CA1 (Fiala *et al.*, 2002). De este modo y de acuerdo con la modificación morfológica de las neuronas en CA3, se podría, al menos afectar a CA1.

De igual forma, en peces existen reportes de hipotrofia cerebral, asociada a diversos ambientes naturales (DePascuale *et al.*, 2016). Pravosudov *et al.* (2015) reportan que distintos hábitats (por ejemplo, condiciones de cautiverio de especies de aves del género *Poecile*) ejercen efectos sobre el volumen del hipocampo y algunas características generales de las neuronas de dicha área cerebral, tales como densidad y área de somas, así como hipotrofia hipocampal.

Entonces, la exposición crónica al estrés provoca no solo la reducción de la densidad de las espinas en el hipocampo, además de las otras alteraciones ya mencionadas, sino también impacta la corteza pre-frontal medial y las neuronas estelares espinosas de la amígdala medial (meA. Bennur *et al.*, 2007). Por lo tanto, la exposición crónica al estrés durante periodos críticos del desarrollo puede modificar la programación de diversas zonas del cerebro, produciendo cambios persistentes en los organismos. Entre las modificaciones se incluyen una respuesta exacerbada a estresores agudos (Brunton y Russell, 2010; Brunton, 2013). Esta programación puede ocurrir probablemente debido a las modificaciones cerebrales y a la imposibilidad para regular la retroalimentación negativa al HPA.

Finalmente, en el caso de reptiles se desconocen hasta ahora los efectos que la exposición al estrés tiene sobre la citoarquitectura de las áreas del cerebro.

4.7 Exposición al estrés y su efecto sobre la reproducción

Los efectos que la exposición al estrés tiene sobre las funciones reproductivas han sido revisados ampliamente para el caso de mamíferos. Los primeros estudios que abordan los efectos de la exposición al estrés sobre las funciones sexuales estudiaron el impacto de las perturbaciones ambientales sobre la relación entre la densidad poblacional y la eficiencia reproductiva en roedores salvajes (Rivier y Rivest, 1991). Posteriormente, diversas investigaciones han estudiado los efectos de la exposición a diversos estímulos estresores sobre la secreción de hormonas sexuales en la rata. Por ejemplo, en dichos organismos se ha reportado el incremento en los niveles plasmáticos de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés: luteinizing hormone) y de testosterona (T) en

roedores expuestos de manera aguda al estrés (Euker *et al.*, 1975). No obstante, dichas respuestas parecen ser menos consistentes en ratas gonadectomizadas, en las que se han detectado aumentos transitorios (Ajica *et al.*, 1972; Briski y Sylvester, 1988), disminución (Euker *et al.*, 1975), o ausencia de respuesta (Neill, 1970; Blake, 1975).

La exposición prolongada al estrés, por otro lado, inhibe consistentemente la función reproductiva dada la activación exacerbada del eje HPA. Las experiencias adversas durante etapas tempranas, incluyendo la exposición al estrés durante la gestación, pueden también “re-programar” cambios persistentes en diversos sistemas fisiológicos y conductuales (Brunton, 2013), probablemente vía mecanismos epigenéticos (Meaney *et al.*, 2007). Hembras de cerdos de Guinea que fueron expuestas de manera crónica a estrés durante su desarrollo prenatal, mostraron una reducción significativa tanto en el peso de los ovarios como en los niveles plasmáticos de estradiol al llegar a la edad reproductiva, mostrando además alteración en los comportamientos reproductivos (Kapoor y Mathews, 2008). Las ratas hembra de madres expuestas a estrés presentaron durante la época de apareamiento aumento de la agresión y conducta de evitación al macho, así como una reducción del comportamiento de solicitud, incidencia e intensidad de la lordosis (Frye y Orecki, 2002). Por su parte, los machos hijos de madres expuestas a estrés crónico presentaron en la adultez alteraciones del rendimiento sexual, tales como una reducida motivación sexual y actividad copuladora hacia las hembras receptivas (Holson *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2006).

En el caso de reptiles macho, abundante literatura reporta afectaciones en la reproducción tras la exposición a distintos estresores (galápago europeo, *Podarcis sicula sicula*, Manzo *et al.*, 1994; lagartijas árbol, *Urosaurus ornatus*, Knapp y More, 1997; eslizón blanco, *Egermia whitii*, Jones y Bell, 2004; culebra rayada, *Tamnophis sirtalis parietalis*, Moore *et al.* 2000; serpiente de jarretera, *Thamnophis sirtalis concinnus*, Moore *et al.*, 2001; serpiente de árbol marrón, *Boiga irregularis*, Moore *et al.*, 2005; eslizón dorado, *Mabuya carinata*, Yajurvedi y Menon, 2005) o expuestos a implantes de la hormona corticosterona (Lagarto de mancha lateral común, *Uta stansburiana*, DeNardo y Sinervo, 1994; lagartijas de árbol, *Urosaurus ornatus*, Knapp y Moore, 1997; *M. carinata*, Yajurvedi y Nijagal, 2000), mostrando bajo peso testicular, baja gametogénesis

(*M. carinata*, Yajurvedi y Nijagal, 2000; lagartija chipujo, *Anolis sagreris*, Licht, 1967; Lance, 1984; Tokarz, 1987), así como el declive en los niveles plasmáticos de T. En hembras se ha reportado una baja tasa de recrudescencia ovárica (fase caracterizada por numerosos folículos en diferentes estadios de desarrollo) en el camaleón americano, *Anolis carolinensis* (Crew, 1974). Aunque existe muy poca información sobre los efectos del estrés sobre los niveles hormonales de hembras de reptiles, algunos estudios sugieren que los efectos son especie-específicos y dependientes de la condición reproductiva (Cameron *et al.*, 2008; Aguirre-Samudio *et al.*, 2010).

La exposición del feto a niveles excesivos de GC materno ha sido propuesta como el mecanismo mediante el cual los efectos del estrés materno pueden ser transmitidos a la descendencia, debido a que los fenotipos de las crías son muy similares a aquellos expuestos al estrés. Por ejemplo, los ovarios de hembras prenatalmente expuestos al glucocorticoide sintético dexametasona presentaron una menor abundancia de folículos primordiales (Manojlović-Stojanoski *et al.*, 2012). Las implicaciones de ello no se comprenden aún, sin embargo, estudios realizados en mujeres indican que el pool de folículos ováricos puede predecir la capacidad reproductiva en la vida adulta. Así, el número de folículos primordiales durante el inicio de la pubertad podría regular la velocidad a la que serán reclutados para la foliculogénesis. En el supuesto de que los folículos primordiales se agotarán más rápidamente, como en las mujeres estresadas prenatalmente, se predeciría una senescencia reproductiva prematura, lo que requiere de ser corroborado (Brunton, 2013). De manera semejante, la administración prenatal de GC en los testículos causa hipotrofia de las células de Leydig, así como una baja producción de T, lo cual retarda la maduración sexual y el deterioro de las funciones reproductivas y sexuales en los adultos (Pedrana *et al.*, 2008).

Aunado a lo anterior, se ha dedicado mucho esfuerzo a determinar si la CRH y/o péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC¹, por sus siglas en inglés: pro-opiomelanocortin)

¹ La pro-opiomelanocortina (POMC, por sus siglas en inglés: pro-opiomelanocortin) es un polipéptido con 241 residuos de aminoácidos. Este actúa como prohormona, ya que se somete a la escisión proteolítica para producir péptidos bioactivos, incluyendo a la ACTH (Stevens y White, 2010).

modulan la inhibición inducida por el estrés de las funciones reproductivas. Esto, debido al hecho de que se ha observado que las gónadas de roedores contienen receptores y mRNAs para CRH, para péptidos derivados de POMC y sobre todo para corticosteroides suprarrenales (Bardin *et al.*, 1987). Sin embargo, la interpretación de los resultados es a menudo compleja porque las manipulaciones experimentales suelen dar lugar a múltiples cambios endocrinos (Viau, 2012).

Cabe destacar que la mayoría de la investigación para evaluar los efectos del estrés sobre la reproducción se ha conducido en animales de laboratorio o domésticos, en áreas confinadas. En la naturaleza, la intensidad de los estresores podría diferir de la experimental. En el laboratorio se evalúa el efecto de uno o algunos estresores, mientras que en los hábitats naturales son múltiples estresores los que impactan y determinan el éxito reproductivo de las generaciones (Norris y López, 2010). Así, resulta de gran interés obtener la evidencia empírica de respuestas crónicas al estrés en las crías, impuestas por la medida de conservación de los viveros, valorando si las crías de *L. olivacea*, producidas en los viveros de huevos translocados e incubados en NHH y si los neonatos retenidos presentan signos morfológicos y funcionales de sobre-activación del eje HPI, así como los impactos que dichos eventos podrían generar sobre la anatomía gonadal y cito -arquitectura neuronal, en el momento de su emergencia del nido y posterior a la retención de 12 horas.

V. HIPÓTESIS

La incubación de los huevos en nidos hechos por el hombre y la retención de los neonatos de *L. olivacea* generan exposición crónica al estrés que conduce a la sobre-activación del eje hipotalámico-hipofisiario-interrenal.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la exposición crónica al estrés asociados a la incubación de huevos en nidos hechos por el hombre y a la retención de neonatos de *L. olivacea* sobre la activación del eje hipotalámico-hipofisiario-interrenal.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de la incubación de huevos en nidos hechos por el hombre y la retención de neonatos sobre la morfología de las crías de *L. olivacea*.

Evaluar el efecto de la incubación de huevos en nidos hechos por el hombre y la retención de neonatos sobre los niveles séricos de corticosterona en crías de *L. olivacea*.

Identificar el efecto de la incubación de huevos en nidos hechos por el hombre y la retención de neonatos sobre la densidad y área de núcleos de células productoras de corticosterona en la glándula inter-renal.

Caracterizar el efecto de la incubación de huevos en nidos hechos por el hombre y la retención de neonatos sobre la densidad y área de las células epiteliales que conforman los cordones seminíferos de los testículos.

Determinar el efecto de la incubación de huevos en nidos hechos por el hombre sobre la complejidad de las neuronas piramidales de corteza dorsomedial.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

En este trabajo se llevó a cabo un estudio observacional con el objetivo de determinar cuantitativamente las respuestas al estrés asociadas a dos prácticas comunes de conservación de tortugas marinas: la incubación en nidos hechos por el hombre y la retención de neonatos, así como los efectos que dichas respuestas tienen sobre la estructura cerebral y gonadal.

La colecta fue realizada en el campamento de Protección de Tortuga Marina “La tortuga”, ubicado en el kilómetro 13 del boulevard playero del Municipio de Lázaro Cárdenas, Michoacán (Permisos SEMARNAT: CF05459-14-07-13) durante la temporada de anidación del 2013.

Se trabajó con grupos de crías, recién emergidas, a la llegada al mar y retenidas de 12 horas, las cuales fueron incubadas en NN y NHH. Se realizaron tres réplicas (nidos) por grupo (Tabla 1). Una vez obtenidos los datos se procedió a analizar si estos presentaron distribución normal mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov ($\alpha > 0.05$).

Para el caso de las crías recién emergidas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) anidado, para comparar todas las variables (a excepción de los niveles séricos de corticosterona) entre condiciones de incubación (Nido natural y nido hecho por el hombre). Para llevar a cabo estos análisis, utilizamos un modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés: generalized linear model) que anidó condiciones de incubación de crías dentro del número de nido.

Para comparar los niveles séricos de corticosterona en diferentes momentos (emergencia / llegada al mar; emergencia/retención 12h), se llevó a cabo un ANOVA anidado, para el cual se efectuó la anidación de las condiciones de incubación y número de nidos dentro del momento de muestreo. Adicionalmente a lo anterior, se realizó una comparación múltiple mediante pruebas *post-hoc* Fisher LSD ($\alpha \leq 0.05$) con un 95% de confiabilidad, para identificar diferencias significativas entre grupos.

Tabla 1. Muestreo que se llevó a cabo, los momentos de recolección, los órganos recolectados y el sexo de los organismos.

Tipo de nido	Número de nido	Momento de colecta	Sexo		Suero	Órgano muestreado		
			Hembra	Macho		Cerebro	Inter-renales	Gónadas
Natural	1	Emergencia	2	4	6	3	6	4
	2		1	5	6	3	6	5
	3		0	6	5	3	4	6
Hecho por el hombre	1		3	3	6	3	6	3
	2		1	5	5	3	6	5
	3		0	6	6	3	6	6
Natural	1	Llegada al mar			6			
	2				6			
	3				6			
Hecho por el hombre	1				6			
	2				4			
Natural	1		Retención (12h)			6		
	2				6			
	3				6			
Hecho por el hombre	1				4			
	2				2			
	3				2			

En el caso del número de intersecciones dendríticas, también se empleó un ANOVA anidado para comparar el número de las intersecciones entre crías a la emergencia del nido provenientes de NN y NHH. El número de las intersecciones dendríticas por distancia desde el soma, se anidó dentro de las condiciones de incubación y número de nido, utilizando un modelo general no lineal (GNLM, por sus siglas en inglés: generalized non-linear model) con una distribución de Poisson y una función Log.

En el caso de las crías retenidas de 12 horas, los datos morfométricos fueron comparados mediante el análisis de ANOVA anidado, para el cual se efectuó la anidación de las condiciones de incubación y número de nidos dentro del momento de muestreo (Emergencia y retención 12 horas).

El Software Statistica 7 fue utilizado para realizar todos los análisis. Los promedios y los errores estándar son presentados en los gráficos.

VIII. RESULTADOS

IX. CAPÍTULO I

Hatchlings of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* display signs of prenatal stress at emergence after being incubated in man-made nests: *A preliminary report*



Hatchlings of the Marine Turtle *Lepidochelys olivacea* Display Signs of Prenatal Stress at Emergence after Being Incubated in Man-Made Nests: A Preliminary Report

OPEN ACCESS

Edited by:

Wen-Cheng Wang,
National Taiwan Normal University,
Taiwan

Reviewed by:

David Terrington Booth,
The University of Queensland,
Australia
Gail Schofield,
Deakin University, Australia
Mariana M. P. B. Fuentes,
Florida State University, United States

*Correspondence:

Esperanza Meléndez-Herrera
esperanzamelendezherrera@
hotmail.com

Alma L. Fuentes-Farías
almafuentes70@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Marine Conservation and
Sustainability,
a section of the journal
Frontiers in Marine Science

Received: 30 June 2017

Accepted: 24 November 2017

Published: 08 December 2017

Citation:

Herrera-Vargas MA,
Meléndez-Herrera E,
Gutiérrez-Ospina G, Bucio-Piña FE,
Báez-Saldaña A, Siliceo-Cantero HH
and Fuentes-Farías AL (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.
Front. Mar. Sci. 4:400
doi: 10.3389/fmars.2017.00400

Ma. A. Herrera-Vargas¹, Esperanza Meléndez-Herrera^{1*}, Gabriel Gutiérrez-Ospina², Fany E. Bucio-Piña¹, Armida Báez-Saldaña², Héctor H. Siliceo-Cantero¹ and Alma L. Fuentes-Farías^{1*}

¹Laboratorio de Eco-Fisiología Animal, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico, ²Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas Sede I, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Egg translocation and incubation in man-made nests (MMN) are common conservation practices through marine turtle hatcheries worldwide. These measures have been associated with reduced hatching rates, altered hatchling sex ratio, fetal dysmorphic anatomical features, and feeble hatchlings health. Previous studies have shown that MMN and natural nests (NN) provide different incubatory conditions. Therefore, incubatory challenges imposed by MMN conditions on fetal development could induce stress responses affecting hatchlings functional morphology later on life. There is no evidence of incubatory stress associated with conservation measures in turtle fetuses or hatchlings. Thus, in this paper we tested the hypothesis that MMN incubation exposes turtle fetuses to stressing conditions. Given that the hypothalamic-pituitary-interrenal axis begins functioning by day 11 of incubation in reptiles, our experiments explored the effects of incubatory conditions, rather than those associated with translocation, on fetal stress responses. We showed that *Lepidochelys olivacea* hatchlings incubated in MMN displayed reduced body weight, hypertrophic inter-renal glands, testicular hypotrophy and hypotrophic dorso-medial cortical pyramidal neurons, when compared with hatchlings emerging from NN. Furthermore, MMN hatchlings had higher serum levels of corticosterone at emergence, and displayed an attenuated acute stress response after traversing the beach. Therefore, the relocation of nests to protect them could negatively impact the health and survival of sea turtles. Thus, this action should only be undertaken when no alternative is available.

Keywords: hypothalamic-pituitary-adrenal axis, fetal development, artificial nesting, Lázaro Cárdenas Michoacán, reproductive success, hatcheries, conservation, early-life stress

INTRODUCTION

Sea turtle populations have been declining through the last century (Sarti et al., 2007; Seminoff and Shanker, 2008). Several conservation strategies aimed at reversing these trends are currently in practice (Eckert et al., 1999). The creation of hatcheries where turtle eggs are translocated from natural nests (NN) and incubated in man-made nests (MMN) is one of the main strategies currently used. Hatcheries protect turtle eggs from poaching, predation, and beach erosion, factor all that could reduce marine turtles' reproductive success (Seminoff et al., 2003; Abreu-Grobois and Plotkin, 2008). However, egg translocation to and incubation in MMN is associated with reduced hatching and emergence success (Limpus et al., 1979; Parmenter, 1980; Eckert and Eckert, 1990; McElroy et al., 2015; Ahles and Milton, 2016), weak hatchling health (Maulany et al., 2012), misbalance sex ratio (Pintus et al., 2009), and increased frequency of fetal dysmorphic anatomical features (Sönmez et al., 2011). Although the precise mechanism underlying these negative outcomes is unclear, it is possible that mechanical, humidity, thermal and microbiological conditions (Chan et al., 1985; Booth and Astill, 2001; Arzola-González, 2007; Tuttle and Rostal, 2010; DeGregorio and Southwood, 2011; Patino-Martinez et al., 2012) in MMN could induce fetal incubatory stress responses.

Stress is a physiological response triggered by stimuli that challenge body homeostasis (Chrousos and Gold, 1992). During the stress response, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis releases catecholamines and gluco-corticoids into the blood stream. Metabolic adjustments (e.g., increased glucose serum availability) follow the rise of these hormones (Chrousos and Gold, 1992; Tsigos and Chrousos, 2002). Under acute circumstances, all these adjustments subside in a matter of minutes to few hours (McEwen, 2000; Tsigos and Chrousos, 2002), and the organism recovers its homeostatic state (McEwen, 2000). However, when the organism is chronically challenged, it develops sustained, chronic allostatic stress responses, which predisposes the organism to develop different functional and morphological disorders (Avitsur and Sheridan, 2009). This is especially true when exposure to stressing conditions occurs during prenatal development (Kapoor and Matthews, 2008).

Hence, in the present study, we evaluated whether *L. olivacea* hatchlings produced by eggs translocated and incubated in MMN had functional and morphological signs of stress at emergence, suggesting their exposure to stressing conditions during fetal life. Given that the hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis in turtles begins functioning between days 11 and 15 of incubation (Kuntz, 1912; Pearson et al., 1983; Milano, 1991; Jenkins and Porter, 2004), it is probable that our results predominantly reflect the effects of MMN incubatory conditions, rather than effects associated with egg translocation.

MATERIALS AND METHODS

Study Site and Nesting Conditions

L. olivacea hatchlings were collected and sampled during the 2013 reproductive season. NN hatchlings had an average of $47.66 \pm$

1.52 incubation days by the time of emergence. MMN hatchlings had an average of 53.5 ± 2.42 incubation days by the time of emergence. All nests were built through the beach “Barra de Pichi” in Lázaro Cárdenas, Michoacán, México (Supplementary Figure 1); MMN hatchlings emerged in the hatchery “La Tortuga” ($17^{\circ}58'23.86''$ N; $102^{\circ}19'24.63''$ W; 7 feet altitude; Google earth image @2016 Digital globe @Google; Supplementary Figure 2). Egg translocation and reburial in MMN were performed by hatchery staff and followed protocols recommended by the Mexican official norm (NOM-162-SEMARNAT-2011, http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5233078). Briefly, hatchery personnel patrolled the beach at night to identify nesting turtles. Once the nesting female was spotted, staff carefully removed the sand and collected the entire clutch after oviposition was completed and the turtle had left the nest; eggs were placed in plastic bags and transported to the hatchery. The complete clutch was reburied with wet sand followed by dry sand. At all times, efforts were made to avoid egg rotation and major mechanical perturbations. Egg translocation and reburial took no more than 2 h. Natural incubation occurred, on the other hand, near the hatchery, 80 m away from the tide line (Supplementary Figure 2). Staff personnel patrolled the beach to locate nesting females. The staff circle-fenced the nesting site using a wire-made meshwork, after the females had left the nest.

Hatchlings Collection

All hatchlings used for the histological and/or the biochemical analyses at emergence or at sea arrival were collected from the same nests.

Seventeen hatchlings from NN ($n = 3$) and 17 hatchlings from MMN ($n = 3$) were captured for conducting the anatomical evaluation of the brain, gonads and inter-renal glands, and corticosterone measurements in serum samples at emergence (Supplementary Table 1). During specimen collection, hatchlings were randomly taken, one by one, at 5-min intervals, as they surfaced. Hatchlings were weighed on a roman tubular precision scale, measured using a digital Vernier (snout-vent and carapace lengths) and decapitated. The blood was individually collected in microfuge tubes. Then, the heart was exposed by surgically removing the pectoral scutes; additional blood samples were withdrawn by direct heart puncturing. In the meantime, a second researcher dissected the brains and placed them into light protected vials containing the Golgi's solution (see below). Samples were kept at ambient temperature until further processing. Finally, the rest of the plastron was removed and the inter-renal glands and the gonads were dissected from the abdominal cavity and placed in vials containing buffered paraformaldehyde (4%) and kept at ambient temperature until reaching the laboratory where they were stored at 4°C .

To estimate corticosterone serum levels at sea arrival, we captured 18 hatchlings from NN ($n = 3$) and 10 hatchlings from MMN ($n = 2$) (Supplementary Table 1). Hatchlings used for estimating corticosterone serum levels at sea arrival were also taken one by one, transferred to a common departing site located 20 m away from the shoreline, but close to the nest they emerged. Once placed in the “start” site, they were set free to crawl toward

the sea. As soon as they reached the ocean shore, they were recaptured, weighted, measured, decapitated and bled as previously described.

Animal handling, sacrifice, and sampling protocols were all approved by the SEMARNAT's Animal Rights Committee, under the License Number SGPA/DGVS/05459/13; Supplementary Presentation 1, and in full accordance to the Mexican Official Norm, NOM-033-ZOO-1995 for humanitarian sacrifice of domestic and wild animals. The comparisons were made by evaluators blind to the experimental conditions.

Corticosterone Serum Levels

Serum samples were obtained after centrifuging the coagulated blood during 15 min at 2,000 rpm and ambient temperature using a portable microfuge (Eppendorf). The samples were stored in liquid nitrogen and, once in the laboratory, were kept frozen at -80°C until further processing. Corticosterone levels were measured using an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ALPCO, 55-CORMS-E01), following the manufacturer's instructions. The intra-assay variation coefficient was 2.8–8.3% and the assay sensitivity was 4.1 ng/mL.

Histological Procedures

Inter-renal glands and gonads were weighted with an analytical micro-balance (Mettler Toledo, MX, Max 5.1 g d = 1 μg), embedded in paraffin through conventional methods and sliced (5 μm) using a microtome. Sections were mounted onto gelatin-coated slides, de-waxed, hydrated, and stained with hematoxylin-eosin (Merck). Finally, slides were dehydrated, xylene-cleared and cover-slipped using Cytoseal 60 (Richard Alan Scientific).

The brains, on the other hand, were rapidly dissected, weighed and processed immediately for Golgi impregnation following the manufacturer's instructions (Golgi Staining Kit II Neurotechniques Inc). The brains were cut through the coronal plane (200 μm) using a cryostat. Sections were mounted onto gelatin-coated slides, air-dried, xylene-cleared, and cover-slipped.

Quantitative Organ Cyto-Morphology

Inter-renal Glands

Twelve longitudinal sections (5 μm) per turtle were randomly sampled along each inter-renal gland. Steroid-producing cells per animal (Ray and Maiti, 2001) were counted in all sections and their nuclear area estimated in digital photomicrographs taken at x1,000 (Leica DM3000); cell counts and nuclear tracing were performed manually using the NIH ImageJ software. Cell density was estimated by dividing the number of cell nuclei on the total area sampled.

Testes

As shown in Supplementary Table 1, histological evaluation of the gonads showed that most of the hatchlings captured and sampled happened to be males. Our observation does not necessarily mean that there is a male predominance in all nests analyzed given that in our study (1) hatchling sampling number per nest was small, (2) we did not estimate sex ratio per

nest, (3) hatchlings capturing was arbitrary, and (4) capturing only lasted approximately an hour. In addition, several factors may explain male predominance in our samples, including that female hatchlings pip at a slower pace than male ones (Mahmoud et al., 2005), that marine turtles nest emergence is asynchronous (Houghton and Hays, 2001), and that nest emergence is dependent on the development of a time sense by the hatchlings (Salmon and Raising, 2014); this varies among individuals. Therefore, our hypothesis was evaluated in males because they were more numerous.

Two longitudinal slices (5 μm) were taken approximately from the middle section of the gonad and were randomly and digitally photographed at x400 using a Leica DM3000 microscope. The circularity index of the seminiferous cords was estimated with the aid of ImageJ. The 50 cords with the highest circularity index were selected. The average circularity index for hatchlings emerging from NN was 0.990 ± 0.01 , and for hatchlings emerging from MMN was 0.991 ± 0.01 . The average testicular epithelial cell number per seminiferous cord was then manually counted in both groups of hatchlings using x400 digital images and the ImageJ software.

Neurons

Dorso-medial pyramidal neurons ($n = 10$ per turtle) were manually drawn with the aid of a camera Lucida adapted to a bright field Leica microscope. Neuron drawings were then scanned and digitized. Dendritic complexity was evaluated using Sholl's analyses (Shankaranarayana Rao et al., 2001); concentric rings were separated from each other by 10 μm intervals. The number of intersections between dendritic processes and concentric rings was counted. In addition, the area of neuronal cell bodies was estimated by digitally creating a mask of each soma that later was automatically measured with the aid of ImageJ.

Statistical Analyses

Data of all variables in both animal groups were normally distributed and had variance homogeneity, with the exception of the number of dendritic intersections (Kolmogorov-Smirnov tests, $\alpha > 0.05$).

Nested analysis of variance (ANOVA) were conducted to compare all variables (with the exception of serum levels of corticosterone and number of dendritic intersections) among treatments, and to evaluate variability among groups within treatments. For conducting these analyses, we used a generalized linear model (GLM) that nested hatchlings groups within treatments.

To compare serum corticosterone levels at different times (emergence/sea arrival) and between treatments, a nested ANOVA was conducted nesting groups within sampling condition (at emergence and at sea arrival) or treatments. Additionally, a Fisher LSD multiple comparison post hoc tests with 95% ($\alpha \leq 0.05$) confidence was carried out to identify significant differences among groups.

Finally, we also used a nested ANOVA to compare the number of dendritic intersections between hatchling groups. The number of dendritic intersections was then nested within groups and

treatments, using a generalized non-linear model (GNLM) with a Poisson's distribution and a Log function. Statistica 7 software was used to perform all analyses. Means and standard errors are presented.

RESULTS

Macroscopic Measures

MMN hatchlings displayed significantly lower body weights (15.84 ± 0.43 g) than NN hatchlings [17.02 ± 0.17 g. Nested ANOVA $F_{(1, 30)} = 6.341$, $*p = 0.017$; Supplementary Figure 3A]. In contrast, other parameters were similar, including:

- Body length [Nested ANOVA $F_{(1, 30)} = 1.97$, $p = 0.171$. MMN 66.76 ± 0.42 and NN 67.48 ± 0.59 cm. Supplementary Figure 3B],
- Carapace length [MMN, 42.35 ± 0.40 and NN 42.76 ± 0.34 cm] and width [MMN 35.06 ± 0.25 and NN 34.38 ± 0.37 cm],
- Plastron length [MMN 32.71 ± 0.36 and NN 33.02 ± 0.32 cm] and width [MMN 29.40 ± 0.41 and NN 29.16 ± 0.55 cm],
- Brain weight [MMN, 11.20 ± 0.55 and NN, 10.61 ± 0.51 mg],
- Interrenal gland weight [MMN 6.5 ± 0.92 and NN, 7.83 ± 0.77 mg].

In addition, MMN hatchlings had significantly lighter testicles (1.95 ± 0.19 mg) than NN hatchlings [2.79 ± 0.36 mg. Nested ANOVA $F_{(1, 18)} = 4.59$, $*p = 0.046$].

Glucocorticoid-Producing Cells

Qualitative observations showed that MMN hatchlings display glucocorticoid producing cells with hypertrophied cytoplasm (compare Figures 1A,B). This explained why these cells' nuclear density was significantly reduced in MMN hatchlings ($1,582 \pm 69.10$ cells/mm²) with respect to NN turtles [1993.69 ± 136.88 cells/mm²; Nested ANOVA $F_{(1, 28)} = 7.77$, $*p = 0.009$, Figure 1C]. In addition, glucocorticoid producing cells had significantly larger nuclei (33.42 ± 1.43 μm²) than those observed in NN hatchlings [29.50 ± 0.87 μm², ANOVA $F_{(1, 28)} = 11.14$, $*p = 0.002$, compare Figure 1A and Figure 1B; also Figure 1D].

Corticosterone Serum Levels

At emergence, corticosterone serum levels in MMN hatchlings were significantly higher (30.96 ± 1.57 ng/mL) than those estimated in NN hatchlings (27.27 ± 0.79 ng/mL, Fisher LSD means comparison test, $*p = 0.044$, Figure 1E).

HPA axis over-activation may be inferred by exposing already stressed organisms to additional stressful challenges (Jones and Bell, 2004). Under these circumstances, a discrete increase in corticosterone must be observed in chronically stressed organisms since they already have augmented basal levels of serum corticosterone. This is precisely what happened when MMN hatchlings were subjected to a stressful challenge. Indeed, at the sea arrival, the increase in corticosterone serum levels was significantly reduced in MMN hatchlings (32.43 ± 1.44 ng/mL, Fisher LSD means comparison test, $p = 0.479$, Figure 1E) as compared to their NN counterparts (32.75 ± 1.87 ng/mL, Fisher LSD means comparison test, $\xi p = 0.03$, Figure 1E).

Testicular Cytology

Qualitative observations showed that MMN hatchlings have reduced numbers of epithelial cells in the seminiferous cords and a poorly developed testicular stroma, as compared to NN hatchlings (Figures 2A,B). Quantitative analyses confirm this impression [MMN: 7.22 ± 0.25 cells and NN: 8.39 ± 0.41 cells per seminiferous cord, nested ANOVA $F_{(1, 23)} = 4.844$, $*p = 0.038$, Figure 2C].

Morphology of Pyramidal Neurons

Neurons in the dorso-medial cortex of MMN hatchlings showed a reduced cell area [Nested ANOVA $F_{(1, 13)} = 11.998$, $*p = 0.004$, Figures 3A,B] and decreased dendritic arbor complexity [Nested ANOVA Wald $\chi^2_{(108)} = 539.900$, $*p < 0.001$, Figure 3C] when compared to those observed in NN hatchlings.

DISCUSSION

Incubation in MMN is frequently associated with reduced emergence rate, misbalanced sex ratio, weaker hatchling health, and increased frequency of congenital malformations. It is possible that MMN exposes turtles to an incubatory environment that induces stress in developing fetuses. It has been reported that MMN humidity, temperature (e.g., Reece et al., 2002; Arzola-González, 2007) possibly and microbiological (Bézy et al., 2014) conditions differ from those recorded for NN. In this study, we conducted preliminary experiments that explored whether MMN incubatory conditions induce stress in fetal turtles. Our results support this hypothesis. At emergence, MMN *L. olivacea* hatchlings displayed, lower body weight, hypertrophied glucocorticoid producing cells, hypotrophic testicles, and hypotrophic dorso-medial cortical pyramidal neurons, as well as increased basal corticosterone serum levels. In addition, after crawling through the beach, MMN hatchlings showed an attenuated rise of corticosterone levels. In conjunction, these results suggest that MMN hatchlings developed a stress response during incubation. Because HPI axis begins functioning by day 11 of incubation, it is possible that the functional morphological changes observed in MMN hatchlings predominantly reflect stress induced by incubatory conditions, rather than by translocation. We cannot rule out, however, the possibility that egg translocation could have conditioned HPI axis development through epigenetic mechanisms before the 11th day of incubation. This issue could be addressed by removing eggs from sham NN, holding them out for the time taken to relocate a nest, and finally placing them back into the same sham NN to complete their incubation. If, under these circumstances, hatchlings produced by sham NN had similar functional morphological attributes to those observed in NN hatchlings, it may be concluded that incubatory environment stresses turtle embryonic/fetal development. If, on the other hand, sham NNs and MMNs hatchlings were similar to one another, but differ from NN hatchlings, then the differences among groups could be attributed to translocation. Future studies must be performed to assess both possibilities.

A frequent finding reported in mammals is that gestational stress decreases fetal growth rate (Brunton and Russell, 2010;

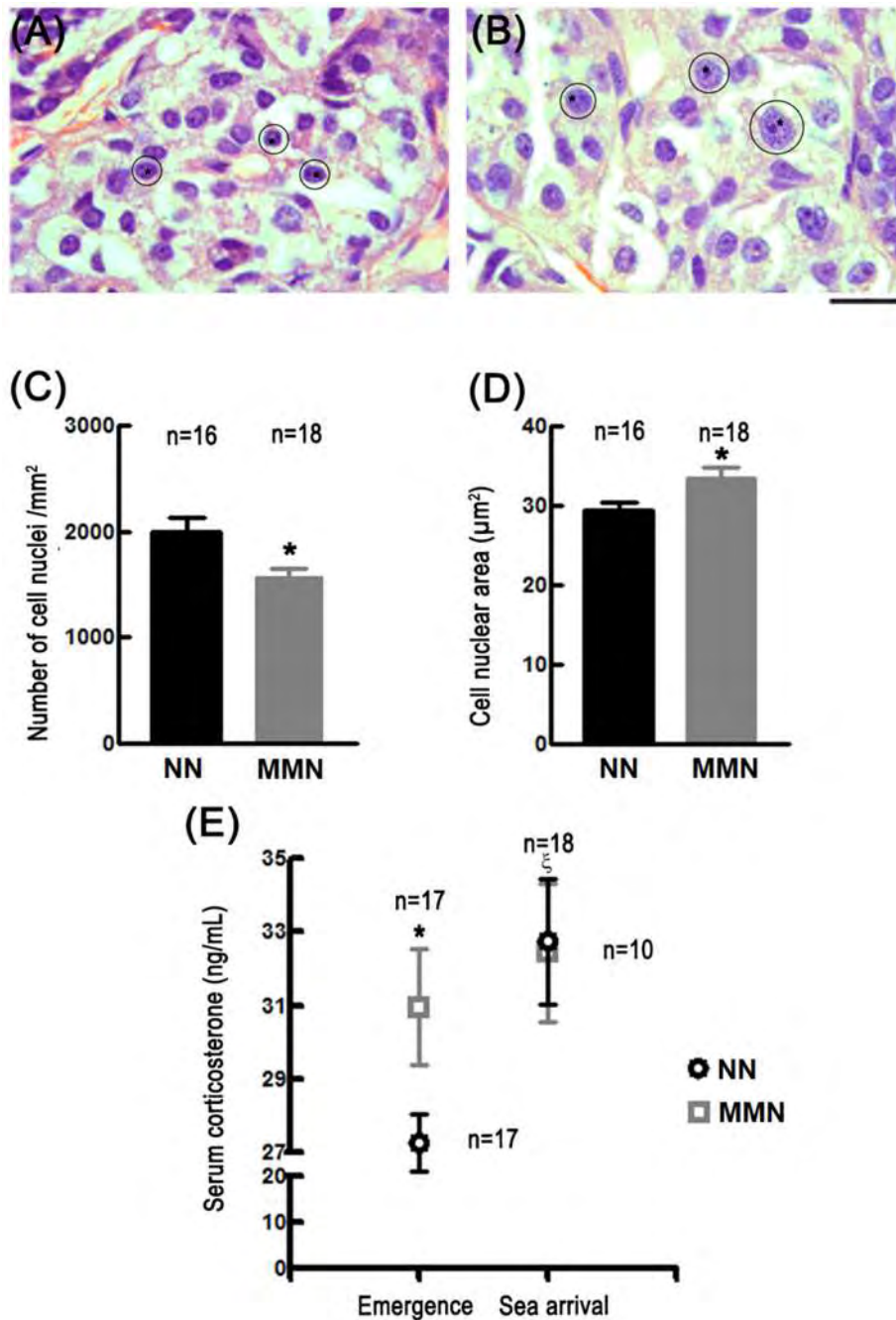


FIGURE 1 | Photomicrographs of histological sections stained with hematoxylin-eosin showing glucocorticoid-producing cells in the interrenal gland of hatchlings that emerged from NN (A) or MMN (B). Notice the enlarged cell nuclei (asterisks and outlines) and hypertrophied cytoplasm in MMN hatchlings. Since lipids were extracted during histological processing, the cytoplasm is observed as a white space surrounding the cell nuclei. Scale bar = 20 μm. Bar graphs that show the nuclear cell density [C; Nested ANOVA $F_{(1, 28)} = 7.77, *p = 0.009$] and cell nuclear area [D; Nested ANOVA $F_{(1, 28)} = 11.14, *p = 0.002$] of glucocorticoid-producing cells in NN and MMN hatchlings. (E) Graph showing corticosterone serum levels in hatchlings from NN or MMN at nest emergence and at sea arrival [Nested ANOVA $F_{(2, 51)} = 5.58, p = 0.006$]. At emergence, serum basal levels were significantly higher in MMN than in NN hatchlings (Fisher LSD means comparison test, $*p = 0.044$); no differences were observed between groups at sea arrival. At sea arrival, the magnitude of the evoked release of corticosterone was significantly lower MMN than in NN hatchlings (intragroup comparisons; Fisher LSD means comparison test, $^{\xi}p = 0.003$).

Brunton, 2013), a circumstance that leads to reduced body weight at birth. In mammals, stress-associated fetal growth retardation commonly results from prenatal undernourishment

due to placental insufficiency, a process mediated by epigenetic mechanisms (Leigh, 2010). Turtles are not placental animals, and most of the energy used by fetuses to grow is allocated in

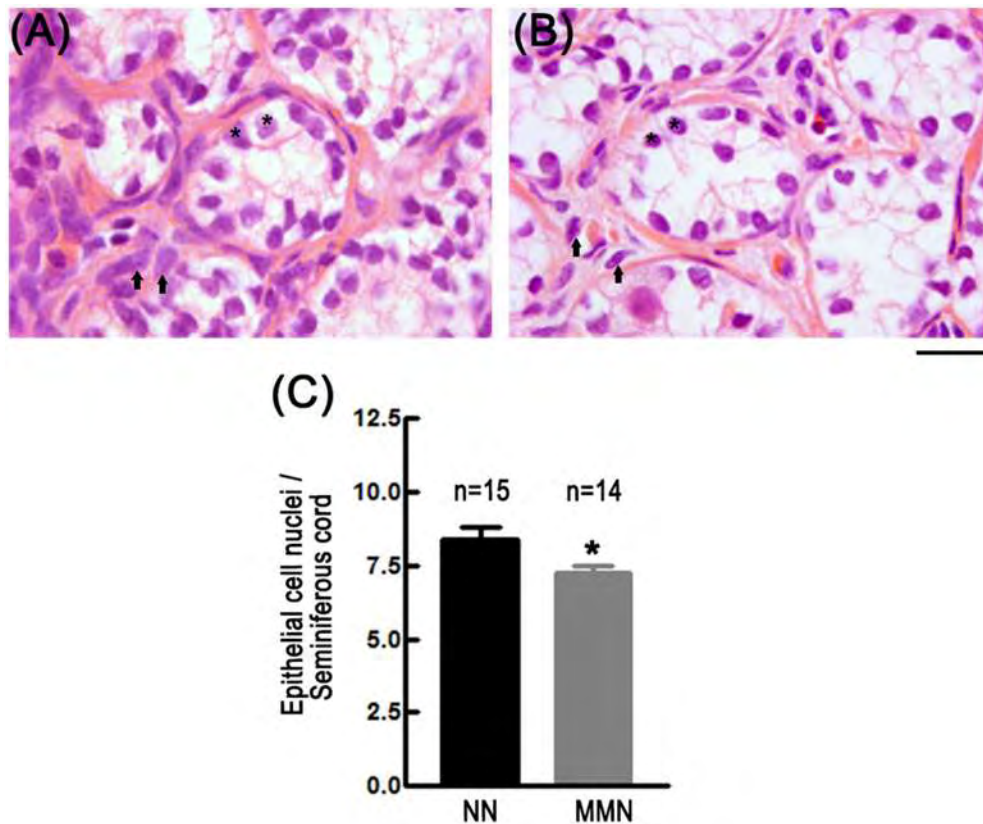
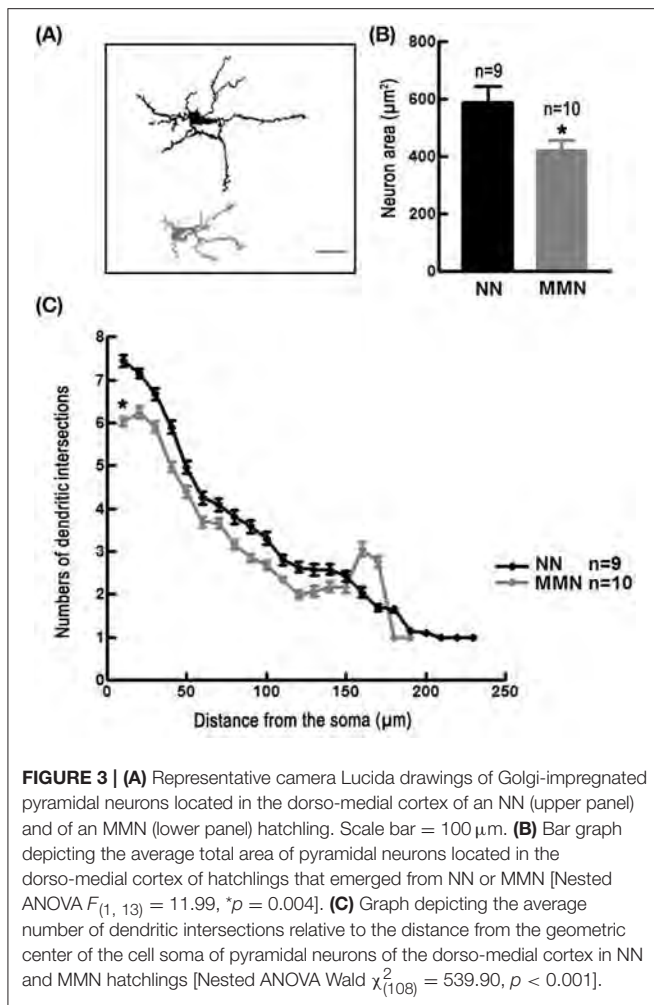


FIGURE 2 | Photomicrographs of histological sections showing epithelial cells of seminiferous cords in NN (A) and MMN (B) hatchlings. Notice that testicles of MMN hatchlings have hypotrophic epithelial (*) and interstitial cells (arrows). The connective tissue surrounding seminiferous tubules is more compact in NN than in MMN hatchlings. Hematoxylin-Eosin staining. Scale bar = 20 μ m. (C) Bar graph that depicts epithelial cell number per seminiferous cord in NN and MMN hatchlings [Nested ANOVA $F_{(1, 23)} = 4.84$, * $p = 0.038$].

the yolk (Hewavisenthi and Parmenter, 2002; Venkatesan et al., 2005). In fact yolk mass, with some contribution of egg mass as an estimation mainly of hydrated albumin mass, correlate positively with hatchlings weight at emergence (Wallace et al., 2006). Therefore, it is possible that the reduced body weight observed in MMN hatchlings at emergence may result from stress-related loss of yolk and egg/albumin mass. However, we did not measure yolk mass at emergence and/or egg mass at laying. Our results do not include egg mass because we wanted to leave NN fully undisturbed to reduce as much as possible the potential sources of stress. Hence, future experiments must evaluate whether MMN incubation decreases yolk and egg size and/or if it shifts their biochemical composition. It will be also useful to study expression and methylation patterns of genes that are involved in modulating fetal growth (e.g., hepatocyte growth factor; Kawashima-Ohya et al., 2011). In spite of these limitations, the differential effects (and the absence of them; e.g., carapace length) that MMN incubatory conditions had on various morphological parameters and on corticosterone serum levels still support the general inference of this work, namely, MNN promotes stress in turtle fetuses.

In mammals, individuals subjected to prenatal stress may develop altered behavior (e.g., aggressiveness, depression; Kapoor and Matthews, 2008; Leigh, 2010), reproductive dysfunction (e.g., infertility; Kapoor and Matthews, 2008), metabolic syndrome (Antti-Jussi et al., 2010), immune depression (Martin, 2009), and even degenerative diseases that affect various organ systems (e.g., cardiovascular) at some point of their lives (Engler, 1995). Prenatal stress also reprograms and imprints gamete genome (Chehreie et al., 2013), thus passing diseased states to the progeny through transgenerational epigenetic inheritance (Jablonka and Raz, 2009; Leigh, 2010; Daxinger and Whitelaw, 2012; Heard and Martienssen, 2014). It is thus possible that worldwide hatcheries release numerous specimens that may be carrying heritable, non-adaptive traits. Although in this work, we did not provide evidence in favor of this possibility, the fact that MMN hatchlings showed testicular hypotrophy and a decreased number of epithelial cells in the seminiferous cords support this possibility. In this regard, one may think that relocation not into a designated hatchery, but to sites closer to dunes may prevent stress-associated, gamete genome reprogramming and imprinting. It is known, nonetheless, that incubatory conditions



differ significantly at different location of the same beach (e.g., Bézy et al., 2014). In spite of uncertainties, and based upon our results, it is probable that some of the current conservation practices may have a negative impact on adult marine turtle survival and reproductive success in the long term. Thus, this action should only be undertaken when no alternative is available.

REFERENCES

- Abreu-Grobois, A., and Plotkin, P. (IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group) (2008). *Lepidochelys olivacea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008:e.T11534A3292503. doi: 10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11534A3292503.en
- Ahles, N., and Milton, S. L. (2016). Mid-incubation relocation and embryonic survival in Loggerhead sea turtle eggs. *J. Wildl. Manage.* 80, 430–437. doi: 10.1002/jwmg.1023
- Pyykkönen A, J., Räikkönen, K., Tuomi, T., Eriksson, J. G., Groop, L., and Isomaa, B. (2010). Stressful life events and the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 33, 378–384. doi: 10.2337/dc09-1027
- Arzola-González, J. F. (2007). Humedad y temperatura en nidos naturales y artificiales de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschsholtz 1829). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 42, 377–383. doi: 10.4067/S0718-19572007000300017

Lastly, the present observations are also significant with regard to other conservation activities conducted by the attending personnel, at least in Mexican hatcheries. Staff -retain hatchlings soon after emergence for several hours (Van de Merwe et al., 2013). This practice provides the opportunity for hatchery managers to raise money by charging a fee to attend hatchling release events. Unfortunately, it also furthers post-emergence stress during the frenzy stage (Wyneken and Salmon, 1992), a critical period in which hatchlings try to avoid predation both on land and in the sea (Pilcher and Enderby, 2001; Burgess et al., 2006; Ischer et al., 2009; Van de Merwe et al., 2013). Based on our results, we recommend that hatchery managers be advised to stop this potentially harmful practice.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MH-V, FB-P, AB-S, and HS-C: carried-out experiments and analyzed data; MH-V, EM-H, GG-O, and AF-F: interpreted results and wrote the manuscript; EM-H, GG-O, and AF-F: designed experiments and obtained funding; All authors reviewed and approved the final version manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT no. 180762 to EM-H and no. 258747 to AF-F). Additional funding was provided by grants from Coordinación de la Investigación Científica to EM-H and AF-F. MH-V and FB-P are Ph.D. and M.S. fellows from CONACYT (CVU 257690 and 738354).

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank to Dr. Jesús Ramírez, Biol. Hugo Olivera Rodríguez, Biol. Edel Pineda López and Saúl González de la Luz for valuable technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2017.00400/full#supplementary-material>

- Avitsur, R., and Sheridan, J. F. (2009). Neonatal stress modulates sickness behavior. *Brain. Behav. Immun.* 23, 977–985. doi: 10.1016/j.bbi.2009.05.056
- Bézy, S. V., Roldán, A. V., and Craig, J. P. (2014). Olive ridley sea turtle hatching success as a function of microbial abundance and the microenvironment of in situ nest sand at Ostional, Costa Rica. *J. Mar. Biol.* 2014:351921. doi: 10.1155/2014/351921
- Booth, D. T., and Astill, K. (2001). Temperature variation within and between nests of the green sea turtle, *Chelonia mydas* (Chelonia: Cheloniidae) on Heron Island, Great Barrier Reef. *Aust. J. Zool.* 49, 71–84. doi: 10.1071/ZO00059
- Brunton, P. J. (2013). Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction* 146, 175–189. doi: 10.1530/REP-13-0258
- Brunton, P. J., and Russell, J. A. (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
- Burgess, E. A., Booth, D. T., and Lanyon, J. M. (2006). Swimming performance of hatchling green turtles is affected by incubation temperature. *Coral Reefs* 25, 341–349. doi: 10.1007/s00338-006-0116-7
- Chan, E. H., Salleh, H. D., and Liew, H. C. (1985). Effects of handling on hatchability of eggs of the leatherback turtle, *Dermochelys coriacea* (L.). *Pertanika* 8, 265–271.
- Chehrie, S., Rabzia, A., and Farhadi-Mesterkhani, M. (2013). Maternal water deprivation affects the spermatogenesis of the offspring rats. *Int. J. Morphol.* 31, 156–161. doi: 10.4067/S0717-95022013000100026
- Chrousos, P. G., and Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders, overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 266, 1244–1252. doi: 10.1001/jama.1992.03480090092034
- Daxinger, L., and Whitelaw, E. (2012). Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 13, 153–162. doi: 10.1038/nrg3188
- DeGregorio, B. A., and Southwood, A. W. (2011). Incubation temperatures and metabolic heating of relocated and *in situ* loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) nests at a Northern Rookery. *Chelonian Conserv. Biol.* 10, 54–61. doi: 10.2744/CCB-0880.1
- Eckert, K. L., Bjørndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A., and Donnelly, M. (1999). *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. SSC/IUCN Marine Turtle Specialist Group Publication No 4. Pennsylvania, PA: Blanchard Press.
- Eckert, K. L., and Eckert, S. A. (1990). Embryo mortality and hatch success in “*in situ*” and translocated leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) eggs. *Biol. Cons.* 53, 37–46. doi: 10.1016/0006-3207(90)90061-S
- Engler, M. B. (1995). Assessment of the cardiovascular effects of stress. *J. Cardiovasc. Nurs.* 10, 51–63. doi: 10.1097/00005082-199510000-00005
- Heard, E., and Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157, 95–109. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.045.NI
- Hewavensithi, S., and Parmenter, C. J. (2002). Egg components and utilization of yolk lipid during development of the flatback turtle *Natur depressus*. *J. Herpetol.* 36, 43–50. doi: 10.1670/0022-1511(2002)036[0043:ECAUOY]2.0.CO;2
- Houghton, J. D., and Hays, G. C. (2001). Asynchronous emergence by loggerhead turtle (*Caretta caretta*) hatchlings. *Naturwissenschaften* 88, 133–136. doi: 10.1007/s001140100212
- Ischer, T., Ireland, K., and Booth, D. T. (2009). Locomotion performance of green turtle hatchlings from the Heron Island Rookery, Great Barrier Reef. *Mar. Biol.* 156, 1399–1409. doi: 10.1007/s00227-009-1180-7123.
- Jablonska, E., and Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.* 84, 131–176. doi: 10.1086/598822
- Jenkins, S. A., and Porter, T. E. (2004). Ontogeny of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the chicken embryo: a review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26, 267–275. doi: 10.1016/j.domaniend.2004.01.001
- Jones, M. S., and Bell, K. (2004). Plasma corticosterone concentrations in males of the skink *Egernia whitii* during acute and chronic confinement, and over a diel period. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137, 105–113. doi: 10.1016/S1095-6433(03)00267-8
- Kapoor, A., and Matthews, S. G. (2008). Prenatal stress modifies behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal function in female guinea pig offspring: effects of timing of prenatal stress and stage of reproductive cycle. *Endocrinology* 149, 6406–6415. doi: 10.1210/en.2008-0347
- Kawashima-Ohya, Y., Narita, Y., Nagashima, H., Usuda, R., and Kuratani, S. (2011). Hepatocyte growth factor is crucial for development of the carapace in turtles. *Evol. Dev.* 13, 260–268. doi: 10.1111/j.1525-142X.2011.00474.x
- Kuntz, A. (1912). The development of the adrenal in the turtle. *Dev. Dyn.* 13, 71–89. doi: 10.1002/aja.1000130105
- Leigh, H. (2010). “How does stress work? The role of memes in epigenesis,” in *Genes, Memes, Culture, and Mental Illness, Toward an Integrative Model*, ed H. Leigh (San Francisco, CA: Springer Press), 11–22.
- Limpus, C. J., Baker, V., and Miller, J. D. (1979). Movement induced mortality of loggerhead eggs. *Herpetologica* 35, 335–338.
- Mahmoud, I. Y., Alkidini, A. Y., Ba-Omar, T. A., Al-Siyabi, S., Al-Bahry, S. N., Elshafie, A. Q., et al. (2005). Emergence pattern of the green turtle, *Chelonia mydas*, hatchlings under laboratory and natural conditions. *Zool. Middle East* 35, 19–28. doi: 10.1080/09397140.2005.10638099
- Martin, L. B., (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 70–76. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.008
- Maulany, R. I., Booth, D. T., and Baxter, G. S. (2012). The effect of incubation temperature on hatchling quality in the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia: implications for hatchery management. *Mar. Biol.* 159, 2651–2661. doi: 10.1007/s00227-012-2022-6
- McElroy, M., Dodd, M. G., and Cattleberry, S. B. (2015). Effects of common loggerhead sea turtle nest management methods on hatching and emergence success at Sapelo Island, Georgia, USA. *Chelonian Conserv. Biol.* 14, 49–55. doi: 10.2744/ccab-14-01-49-55.1
- McEwen, S. B. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886, 172–189. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02950-4
- Milano, E. G. (1991). Development of the adrenal gland in amniotes: a comparison between chelonians and birds. *Boll. Zool.* 58, 205–209. doi: 10.1080/11250009109355753
- Parmenter, C. J. (1980). Incubation of the eggs of the green sea turtle, *Chelonia mydas*, in Torres Strait, Australia: the effect of movement on hatchability. *Aust. Wildl. Res.* 7, 487–491. doi: 10.1071/WR9800487
- Patino-Martinez, J., Marco, A., Qui-oñes, L., Abella, E., Abad, R. M., and Diéguez-Uribeondo, J. (2012). How do hatcheries influence embryonic development of sea turtle eggs? Experimental analysis and isolation of microorganisms in Latherback turtle eggs. *J. Exp. Zool.* 317, 47–54. doi: 10.1002/jez.719
- Pearson, A. K., Wurst, G. Z., and Cadle, J. E. (1983). Ontogeny and immunocytochemical differentiation of the pituitary gland in a sea turtle, *Caretta caretta*. *Anat. Embryol.* 167, 13–37. doi: 10.1007/BF00304598
- Pilcher, N. J., and Enderby, S. (2001). Effects of prolonged retention in hatcheries on green turtle (*Chelonia mydas*) hatchling swimming speed and survival. *J. Herpetol.* 35, 633–638. doi: 10.2307/1565902
- Pintus, K. J., Godley, B. J., McGowan, A., and Broderick, A. C. (2009). Impact of clutch relocation on green turtle offspring. *J. Wildl. Manage.* 73, 1151–1157. doi: 10.2193/2008-103
- Ray, P. P., and Maiti, B. R. (2001). Adrenomedullary hormonal and glycemic responses to high ambient temperature in the soft-shelled turtle, *Lissemys punctata punctata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 22, 17–22. doi: 10.1006/gcen.2001.7606
- Reece, S. E., Broderick, A. C., Godley, B. J., and West, S. A. (2002). The effects of incubation environment, sex and pedigree on the hatchling phenotype in a natural population of loggerhead turtles. *Evol. Ecol. Res.* 4, 737–748. Available online at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.571.9060&rep=rep1&type=pdf>
- Salmon, M., and Raising, M. (2014). Emergence rhythms of hatchling marine turtles: is a time sense involved? *Chelonian Conserv. Biol.* 13, 282–285. doi: 10.2744/CCB-1121.1
- Sarti, S. L., Barragán, R. A., García, M. D., García, N., Huerta, P., and Vargas, F. (2007). Conservation and biology of the Leatherback turtle in the Mexican Pacific. *Chelonian Conserv. Biol.* 6, 70–78. doi: 10.2744/1071-8443(2007)6[70:CABOTL]2.0.CO;2
- Seminoff, J. A., Jones, T. T., Reséndiz, P. A., Wallace, J. N., and Chaloupka, M. Y. (2003). Monitoring green turtles (*Chelonia mydas*) at a coastal foraging area in Baja California, Mexico: multiple indices describe population status. *J. Mar. Biol.* 83, 1355–1362. doi: 10.1017/S0025315403008816
- Seminoff, J. A., and Shanker, K. (2008). Marine turtles and IUCN red listing: a review of the process, the pitfalls, and novel assessment approaches. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 356, 52–68. doi: 10.1016/j.jembe.2007.12.007
- Shankaranarayana Rao, B. S., Govindaiah, Laxmi, T. R., Meti, B. L., and Raju, T. R. (2001). Subicular lesions cause dendritic atrophy in CA1 and CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Neuroscience* 102, 319–327. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00462-0
- Sönmez, B., Cemal, T., and Sükran, Y. Ö. (2011). The effect of relocation on the morphology of Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), hatchlings on Samandag beach, Turkey. *Zool. Middle East* 52, 29–38. doi: 10.1080/09397140.2011.10638476
- Tsigos, C., and Chrousos, P. G. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 53, 865–871. doi: 10.1016/S0022-3999(02)00429-4

- Tuttle, J., and Rostal, D. (2010). Effects of nest relocation on nest temperature and embryonic development of Loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Chelonian Conserv. Biol.* 9, 1–7. doi: 10.2744/CCB-0769.1
- Van de Merwe, J. P., Ibrahim, K., and Whittier, J. M. (2013). Post-emergence handling of green turtle hatchlings: improving hatchery management worldwide. *Anim. Conserv.* 16, 316–323. doi: 10.1111/j.14691795.2012.00603.x
- Venkatesan, S., Kannan, P., Rajagopalan, M., and Vivekanandan, E. (2005). Embryonic energetics in the egg of the green turtle *Chelonia mydas*. *J. Mar. Biol. Ass. India* 47, 193–197. Available online at: <http://eprints.cmfri.org.in/2060/>
- Wallace, B. P., Sotherland, P. R., Tomillo, P. S., Bouchard, S. S., Reina, R. D., Spotila, J. R., et al. (2006). Egg components, egg size, and hatchling size in leatherback turtle. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 145, 524–532. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.08.040
- Wyneken, J., and Salmon, M. (1992). Frenzy and post frenzy swimming activity in Loggerhead, Green, and Leatherback hatchling sea turtles. *Copeia* 1992, 478–484. doi: 10.2307/1446208

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Herrera-Vargas, Meléndez-Herrera, Gutiérrez-Ospina, Bucio-Piña, Báez-Saldaña, Siliceo-Cantero and Fuentes-Farías. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

X. CAPÍTULO II

Efectos de la exposición prenatal al estrés asociado a la incubación artificial, sobre el desarrollo de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*)

Efectos de la exposición prenatal al estrés asociado a la incubación artificial, sobre el desarrollo de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*)

Ma. Antonia Herrera Vargas¹, Esperanza Meléndez Herrera¹✉, Gabriel Gutiérrez Ospina² y Alma Lilia Fuentes Farías¹✉

¹Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA), UMSNH. Av. San Juanito Itz'icuaró s/n, colonia Nueva Esperanza, c.p. 58330

²Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510 Ciudad de México, Distrito Federal.

Resumen

Las tortugas marinas son consideradas como amenazadas o en peligro de extinción. Debido a ello, se han establecido viveros a donde los huevos recién depositados por las hembras son trasladados e incubados en nidos artificiales como estrategia de conservación “*ex-situ*”. A lo largo del tiempo, efectos negativos de la incubación artificial en las crías han sido documentados, sugiriendo que los factores físicoquímicos de los nidos artificiales pudieran ser la causa. Nuestra hipótesis es que el traslado y la incubación artificial generan una exposición crónica al estrés en los embriones/fetos de *Lepidochelys (L.) olivacea*. Esta exposición resultará en alteraciones de la citología neuronal de algunas regiones cerebrales, incremento en la masa de las glándulas hipófisis y adrenales, así como un decremento de la masa gonadal y un incremento en la concentración sérica de corticosterona. La elección de los órganos se basa en evidencia proveniente de mamíferos que muestra que la exposición crónica al estrés durante etapas tempranas de la ontogenia produce sobreactivación del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HHA) y disminución de la actividad del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal (HHG). A su vez, la hiperactividad del eje HHA modifica la arquitectura de circuitos neuronales conduciendo a alteraciones conductuales, cognitivas y reproductivas. Los resultados obtenidos hasta ahora apoyan la hipótesis propuesta, ya que los animales eclosionados en nidos artificiales presentan alteraciones en la citoarquitectura neuronal de regiones como el hipotálamo, la corteza dorsomedial y la amígdala. Además, sus hipófisis y glándulas adrenales presentan una mayor masa (datos que apoyan la sobre actividad del eje HHA). Por el contrario, se observó una disminución significativa en la masa de sus gónadas ($t=0.0078^*$, $p<0.05$), así como una menor masa corporal ($t=0.0164^*$, $p\leq 0.05$). Finalmente, nuestros resultados muestran que las crías de nidos artificiales presentan un incremento en los niveles circulantes de corticosterona ($t=0.0216^*$, $p\leq 0.05$).

Palabras clave: Corticosterona, neuronas, nidos artificiales, crías.

Summary

Sea turtles are considered threatened or endangered. As a result, nurseries have been established where fresh eggs laid by females are transferred and incubated in artificial nests as an “*ex-situ*” conservation strategy. Over time negative effects of artificial incubation on the offspring have been documented, suggesting that physicochemical factors of artificial nests may be the cause. Our hypothesis is that relocation and artificial incubation generate chronic stress exposure in *Lepidochelys (L.) olivacea* embryos/fetus. This exposure would result in alterations in the neural cytoarchitecture of some brain regions, an increase in the mass of the pituitary and adrenal gland, a decrease in the mass of the gonad and an increase in serum corticosterone concentration. The organs that were analyzed were chosen based on evidence from mammals showing that chronic stress exposure during early stages of ontogeny causes over-activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and a decrease in hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis activity. The hyperactivity of the HPA axis modifies neural circuit architecture leading to behavioral, cognitive and reproductive alterations. The results obtained so far support the proposed hypothesis, since animals hatched from artificial nests show alterations in the neural cytoarchitecture of brain areas such as the hypothalamus, dorsomedial cortex and amygdala. Additionally, their pituitary and adrenal glands have a higher mass (data supporting HPA axis over-activity). By contrast, a significant decrease in the mass of their gonads ($t=0.0078^*$, $p\leq 0.05$) was observed and they had lower body mass ($t=0.0164^*$, $p\leq 0.05$). Finally, our results show that turtles hatched in artificial nests have increased levels of circulating corticosterone ($t=0.0216^*$, $p\leq 0.05$).

Key words: Corticosterone, neurons, artificial nests, hatchlings.

Introducción

Las tortugas marinas se encuentran clasificadas como especies “en peligro crítico”, “en peligro” o “vulnerables” a la extinción, según acuerdos de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (<http://www.iucn.org>) y la norma (NOM)-059-SEMARNAT-2010. Se han desarrollado estrategias

de conservación orientadas a prevenir la extinción de las especies y promover la recuperación y el sostenimiento de poblaciones saludables de tortugas marinas, que realicen eficientemente sus funciones ecológicas (Eckert *et al.*, 1999). Tales estrategias han incluido la creación de viveros a donde son reubicados aquellos nidos en riesgo, lo cual implica el expolio, traslado y reintierro de los huevos recién ovopositados por las hembras. Durante este proceso, los huevos están expuestos a movimientos de rotación o vibración causada por la manipulación, lo cual se ha documentado, afecta negativamente el desarrollo embrionario del organismo (Limpus *et al.*, 1979; Parmenter, 1980; Pintus *et*

✉ **Autores de correspondencia:** Esperanza Meléndez Herrera y Alma Lilia Fuentes Farías, Laboratorio de Ecofisiología Animal, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, UMSNH. E-mails: oazul74@yahoo.com.mx y almafuentes70@hotmail.com

al., 2009; Sönmez *et al.*, 2011). Adicionalmente, la exposición prolongada a la intemperie provoca la desecación del *muscu* transparente que recubre los huevos, el cual tiene propiedades anti-patógenas (Phillot y Parmenter, 2012). Aunado, la arquitectura del nido artificial de los viveros dista mucho de la del nido natural, resultando en un incremento de la compactación de la arena que a su vez reduce la disponibilidad de oxígeno para los organismos en desarrollo (Baldwin *et al.*, 1989; Chacón *et al.*, 2007).

Existe una gran cantidad de trabajos que documentan efectos negativos de la incubación en nidos artificiales sobre el éxito de eclosión (Eckert y Eckert, 1990; Marcovaldi y Laurent 1996; Rees *et al.*, 2002; Özdemir y Türkozan, 2006; McElroy, 2009), la salud (Booth *et al.*, 2004), la proporción de sexos (Mrosovsky e Yntema, 1980; Morreale *et al.*, 1982; Mrosovsky, 2008, Pintus *et al.*, 2009), el fenotipo de las crías (Reece *et al.*, 2002), el tiempo de incubación y la pérdida del grado de sincronización en la emergencia (Koch *et al.*, 2006). En conjunto, estos trabajos han cuestionado el éxito de los actuales programas de conservación de tortugas marinas.

Estudios en diversas especies animales, han mostrado que la exposición crónica al estrés prenatal afecta el éxito del nacimiento, así como la anatomía y ensamble de los circuitos neuronales en diversas regiones cerebrales (Mandyam *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2005; Denver, 2009; Morales-Medina *et al.*, 2009; Boyle, 2013), lo que conduce a trastornos conductuales (Kim y Yoon, 1998; Stewart *et al.*, 2005) y a alteraciones del eje hipotálamico-hipofisiario-gonadal (HHG). Por lo tanto no es de sorprender que la exposición a estresores físicos y/o psicológicos perturbe las capacidades sexuales y/o reproductivas (Denardo y Lighr, 1993; Chrousos *et al.*, 1998; Osadchuk *et al.*, 2000; Mulder *et al.*, 2002; Greenberg, 2002; Kapoor y Matthews, 2008), además de predisponer a una serie de patologías metabólicas (Greenberg y Wingfield, 1987).

Durante la exposición a estrés el sistema nervioso simpático y el eje hipotálamico-hipofisiario-adrenal (HHA) son activados, y varias hormonas son liberadas en grandes cantidades, incluyendo la hormona liberadora de corticotropina (CRH), adrenocorticotropina, glucocorticoides (corticosterona y cortisol) y catecolaminas (Donaldson, 1981; Pottinger y Carrick, 1999; Schreck *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2005). Los glucocorticoides proveen una retroalimentación negativa al eje, limitando así su activación. Adicionalmente, existen algunas estructuras cerebrales como el hipocampo y la amígdala capaces de modificar la activación del eje HHA. El hipocampo es una estructura cerebral relacionada con la memoria y el aprendizaje, pero además es clave en la acción retroinhibitoria de la actividad hipotalámica. Por su parte, la amígdala está implicada críticamente en la modulación del comportamiento, las emociones y su actividad favorece la liberación de CRH desde el hipotálamo (Beaulieu *et al.*, 1989; Tannahill *et al.*, 1991).

De todo lo anterior, se podría deducir que el programa de expoliación, traslado e incubación controlada de huevos de tortuga marina genera una exposición crónica al estrés durante el período prenatal en los embriones/fetos, influenciando de manera negativa a corto y/o largo plazo, la historia de vida como individuo o especie de las tortugas marinas. Así la presente

propuesta pretende monitorear parámetros neuroendocrinos relacionados con la exposición crónica al estrés impuesta por la incubación artificial, en crías de la especie de tortuga marina *L. olivacea*. Se propone medir los niveles de corticosterona en suero y estudiar la citoarquitectura de algunas regiones cerebrales como la corteza dorsomedial (estructura análoga al hipocampo de mamíferos), hipotálamo y amígdala, así como medir la masa de las glándulas hipófisis, adrenales y las gónadas. Lo anterior, con el fin de proporcionar información sobre el posible riesgo de supervivencia, el adecuado crecimiento y desarrollo de los organismos, así como aportar bases, de ser el caso, para el replanteamiento de las estrategias de protección para *L. olivacea* y otras especies de tortugas marinas.

Metodología

Grupos experimentales

Se trabajó con dos grupos experimentales de crías recién nacidas: 1) Crías de nidos naturales (NN, n=6); 2) Crías de nidos artificiales (NA, n=6). Se realizaron tres réplicas (nidos) por grupo experimental, de tal manera que se trabajó con un total de 18 animales por grupo.

Obtención de los organismos

Las crías de *L. olivacea* se obtuvieron a partir de tres nidos naturales y de tres nidos artificiales en las playas de Lázaro Cárdenas, Michoacán (Permiso SEMARNAT: CF05459-14-07-13). Se seleccionaron aquellos nidos naturales cuya ovoposición ocurrió entre los días 8 de Septiembre, 22 y 24 de Octubre de 2013. Una vez concluida la puesta de huevos, los nidos fueron resguardados con malla ciclónica durante los cuarenta y cinco días que dura el periodo de incubación. Se seleccionaron aquellos nidos artificiales cuya eclosión ocurrió un día antes del nacimiento programado de las crías de nidos naturales.

Obtención y procesamiento de sangre y órganos

Las crías fueron colectadas al momento de la eclosión, medidas, pesadas y sacrificadas por decapitación. Se colectaron 3 ml de sangre, los cuales fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugados para obtener el suero y cuantificar los niveles de corticosterona de acuerdo al método de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; 55-CORMS-E01, Alpco). Inmediatamente después de obtener la sangre, los cerebros de cada tortuga fueron disecados y fijados en la solución de impregnación del kit Golgi-Cox (PK401; FD Neurotechnologies, Inc). Después de la fijación, los cerebros fueron seccionados coronalmente en criostato (Hydrax C25 Zeiss) y procesados para la impregnación Golgi-Cox (para estudiar la citoarquitectura neuronal). Las neuronas impregnadas fueron reproducidas en cámara lúcida adaptada a un microscopio óptico. Después de obtener el cerebro, el resto del organismo fue preservado en paraformaldehído al 4% y posteriormente fueron disecadas y pesadas sus hipófisis, adrenales y gónadas. Los índices corporales fueron obtenidos a partir de los cocientes resultantes entre la masa del órgano y la masa corporal, multiplicados por 1000 (Chen *et al.*, 2013).

Análisis de Datos

Los datos morfométricos obtenidos y de los ensayos por ELISA fueron analizados mediante la prueba de Shapiro-Wilk para verificar su normalidad y la homogeneidad de varianzas. Mediante una prueba T Student, con un nivel de significancia α de 0.05 se estimaron las diferencias entre los grupos a comparar. El programa utilizado fue SigmaPlot ver.10.

Resultados preliminares

Análisis morfométricos.

Masa y longitud corporal

Los resultados obtenidos muestran que las tortugas eclosionadas en NN presentaron mayor masa corporal que aquéllas eclosionadas de NA ($t=0.0164, *p\leq 0.05$) (Fig. 1A). La longitud corporal (tomada de cabeza a cola) fue mayor en los organismos nacidos de los NN, aunque no se presentaron diferencias significativas. De modo semejante, no se observaron diferencias significativas en la longitud y ancho del plastrón ni del caparazón (datos no mostrados).

Índices corporales

Los análisis revelaron que los organismos eclosionados en NA presentan un mayor índice hipofisariosomático que los organismos eclosionados en NN, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($t=0.0034, *p\leq 0.05$) (Fig 1B). El índice adrenalsomático presentó la misma tendencia anterior aunque las diferencias no fueron significativas (datos no mostrados). Por el contrario, el índice gonadalsomático mostró la tendencia opuesta: se observó una drástica disminución en los organismos nacidos de NA en comparación con los de NN ($t=0.0078, *p\leq 0.05$) (Fig. 1C). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al índice cerebrosomático (datos no mostrados) entre las dos condiciones experimentales.

Niveles séricos de Corticosterona

Se aprecia un aumento estadísticamente significativo en los niveles de corticosterona en los organismos nacidos de NA respecto de los que nacieron de NN ($t=0.0216, *p\leq 0.05$) (Fig 1D).

Citoarquitectura neuronal

De manera cualitativa, hemos encontrado que la incubación artificial se asocia

con árboles dendríticos hipotróficos en las neuronas del hipotálamo y corteza dorsomedial, como se puede observar en la Fig. 2. En el caso de la amígdala se logra apreciar el acortamiento de sus dendritas, pero no del número de ellas (Fig. 2), aun cuando una cuantificación formal deberá ser llevada a cabo para corroborar nuestras observaciones.

Discusión

En la actualidad las poblaciones de las diferentes especies de tortugas marinas se encuentran reducidas. En los últimos años, el hombre ha diezariado drásticamente la capacidad de estas especies para mantener su viabilidad, por lo que la mayoría de sus poblaciones se encuentran en declinación, frecuentemente a niveles críticos (Abreu-Groboi y Plotkin, 2008). México no está excluido de esta problemática, por lo que el gobierno ha establecido diversas acciones encaminadas a la protección, conservación e investigación de tortugas marinas para contrarrestar el deterioro de sus poblaciones. Una de las principales acciones es la creación de viveros a donde son reubicados e incubados la mayor cantidad de huevos recién ovopositados (Eckert 1999; Dutton 2005). Numerosos trabajos previos describen efectos negativos de dicha práctica sobre el éxito de eclosión, la salud, la proporción de los sexos y el aumento de malformaciones de los organismos que de ellos emergen (Glen *et al.* 2005; Adams *et al.* 2007). Sin embargo, hasta el momento no existen trabajos que expliquen la causa de dichos efectos. En este contexto, el presente trabajo pretende demostrar por vez primera que la incubación de crías de tortuga marina en NA genera una respuesta de activación del eje HHA muy semejante a la reportada en mamíferos ante estresores crónicos.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la incubación en NA produce crías con: 1) árboles dendríticos y somas hipotróficas en regiones como la corteza dorsomedial; 2) mayor índices hipofisariosomático y adrenalsomático; 3) menor índice gonadalsomático; 4) menor masa corporal; 5) mayores niveles séricos de corticosterona.

El incremento en los índices hipofisariosomático y adrenalsomático, así como la disminución del gonadalsomático

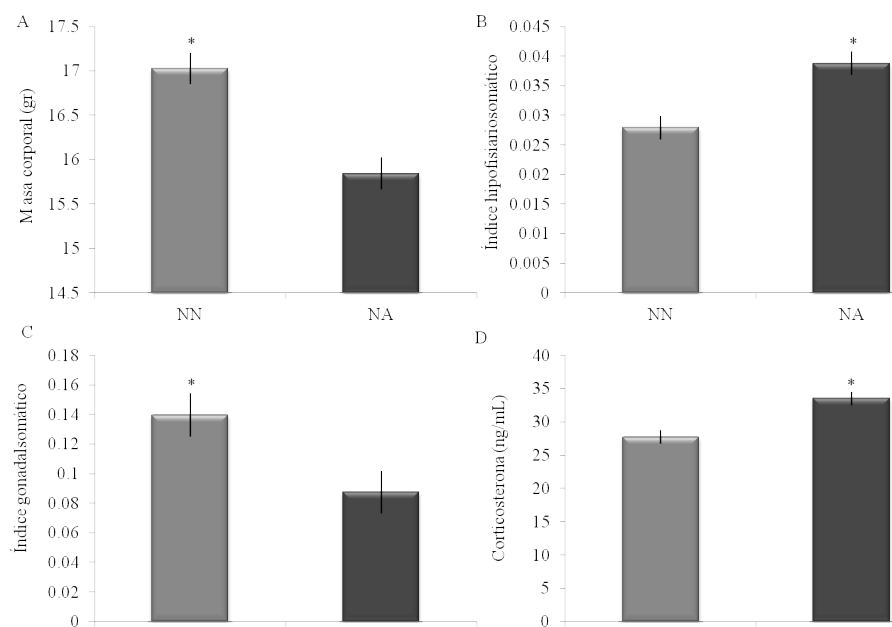


Figura 1. La incubación artificial en viveros modifica el desarrollo de la tortuga *L. olivacea* causada por la exposición crónica al estrés durante su desarrollo embrionario/fetal. Las gráficas muestran: **A)** masa corporal, $n = 18$ y 18 respectivamente, $t = 0.0164, *p\leq 0.05$; **B)** índice hipofisariosomático, $n = 18$ y 18 respectivamente, $t = 0.0034, *p\leq 0.05$; **C)** índice gonadalsomático, $n = 20$ y 28 respectivamente, $t = 0.0078, *p\leq 0.05$; **D)** concentración sérica de corticosterona, $n = 11$ y 11 respectivamente, $t = 0.0216, *p\leq 0.05$. Los resultados se muestran como promedios \pm error estándar de las muestras (ES) entre las crías nacidas de nidos naturales (NN) y de nidos artificiales (NA).

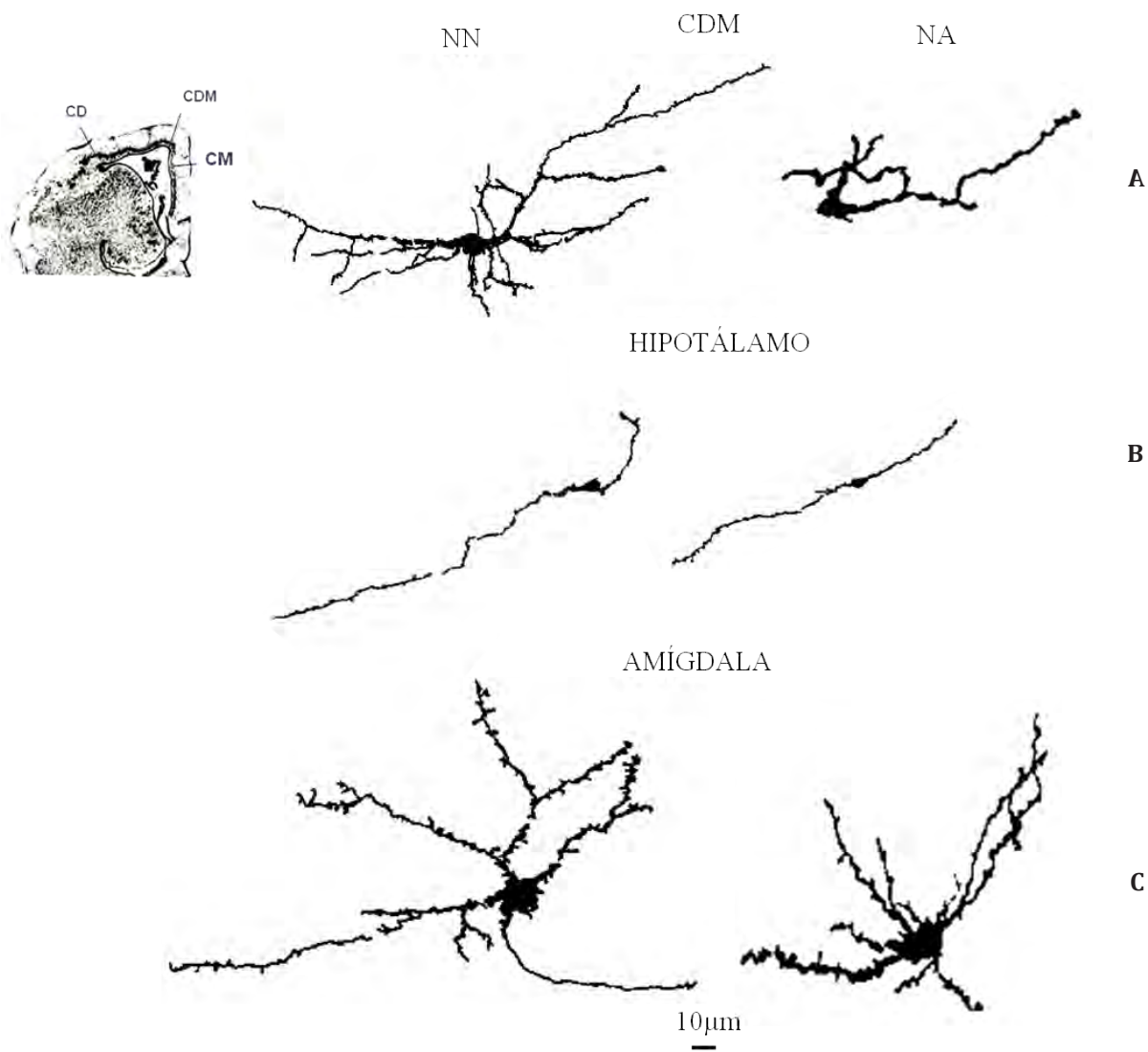


Figura 2. La incubación en nidos artificiales modifica la citoarquitectura neuronal en regiones cerebrales involucradas en la modulación del eje HHA causada por la exposición crónica al estrés durante su desarrollo embrionario/fetal. **A)** Reproducciones representativas de neuronas de la corteza dorsomedial (área homóloga al hipocampo de mamíferos), **B)** del Hipotálamo y **C)** de la Amígdala de crías recién nacidas de *L. olivacea*. NN (Crías nacidas de nidos naturales), NA (Crías nacidas de nidos artificiales). CDM (corteza dorsomedial).

en las crías de NA, sugieren alteraciones en la citoarquitectura de las glándulas y gónadas (Ulrich-Lai *et al.*, 2006). En conjunto, una menor masa corporal y mayores índices hipofisariosomático y adrenalsomático en estos organismos apuntan a sobreactivación del HHA, confirmada por los mayores niveles séricos de corticosterona (33.53 ng/mL). Es interesante notar que los niveles de corticosterona que reportamos para los organismos de NN (27.72 ng/mL) (**Figura 1D**) concuerdan con aquéllos reportados en: 1) juveniles de *Lepidochelys kempii*, quienes muestran niveles de 25 ng/mL durante una hora de manejo agudo por retención (Gregory y Schmid, 2001), y 2) organismos inmaduros de *Chelonia mydas*, quienes presentan niveles de 20 ng/mL durante 3 y hasta 9 horas de retención (Jessop y Hemann, 2005). Estos datos adquieren relevancia si consideramos que la eclosión es un evento que requiere activación controlada del eje HHA que permita a los organismos salir del nido y llegar al mar, por lo que puede ser considerado como un estresor agudo. Así, los todavía más altos niveles que encontramos en *L. olivacea* eclosionadas de NA parecen

validar nuestra idea de una función exacerbada del eje HHA.

Cualitativamente, las neuronas de la corteza dorsomedial e hipotálamo se observaron hipotrofiadas, mostrando cambios en la longitud y número de sus ramificaciones dendríticas. En mamíferos, abundante literatura muestra que la exposición prolongada (crónica) al estrés es capaz de alterar significativamente la expresión genética de los factores que intervienen en el desarrollo de las neuronas de estructuras como el hipocampo y la amígdala (Wood *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2005; Morales-Medina *et al.*, 2009; Vyas *et al.*, 2002; Boyle, 2013), provocando alteraciones en el número y el patrón de sinapsis recibidas por la neurona. Consecuentemente, el resultado de defectos en el crecimiento neuronal es acompañado de severos desórdenes, tales como retraso mental (McA llister, 2000) y alteraciones conductuales, cognoscitivas (Koshibu y Levitt, 2007) y en las respuestas de estrés ante situaciones de peligro. Además, alteraciones en algunos núcleos cerebrales hipotalámicos pueden retardar y/o inhibir la reproducción en estadios adultos (Denardo

y Lighr, 1993; Rodríguez *et al.*, 2007; Kapoor y Matthews, 2008; Chen *et al.*, 2013).

Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que la incubación artificial podría tener un impacto negativo sobre las tortugas marinas al momento de su nacimiento que incluso podría incidir a largo plazo alterando su historia de vida como individuos o especie. Se deberán seguir realizando estudios longitudinales para corroborar los efectos a nivel poblacional y con ello conducir a un análisis y replanteamiento de las estrategias y políticas de conservación a las instancias competentes, a fin de encaminar esfuerzos de prevención sobre los efectos de la exposición crónica al estrés de los embriones/fetos de tortugas marinas.

Agradecimientos

A los biólogos Hugo Olivera Rodríguez y Edel Pineda López por su valiosa ayuda para el procesamiento de los tejidos y la reproducción de las neuronas. Este trabajo fue financiado por: UMSNH/CIC-8.37 ALFF/EMH; CONACYT 82879 GGO/ALFF; 94312 GGO; 180762 EMH; PAPITT IN203912 GGO/ALFF; PROMEP PTC336 EMH. MAHV recibe beca (CVU 257690). Este trabajo se llevo a cabo bajo el Permiso SEMARNAT: CF05459-14-07-13.

Referencias

- Abreu-Grobois A y Plotkin P (IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group)**. 2008. *Lepidochelys olivacea*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on December 18th, 2014.
- Adam V, Tur C, Rees AF, Tomas J**. 2007. Emergence pattern of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) hatchlings from Kyparissia Bay, Greece. *Marine Biology* 151(5): 1743–1749.
- Baldwin J, GE, M.K y Patak A**. 1989. Anaerobic metabolism during dispersal of green and loggerhead turtle hatchlings. *Comp Bio and Phys, Part A Physiology* 94: 663–665.
- Beaulieu S, PG, VH y Barden N**. 1989. Influence of the central nucleus of the amygdale on the content of corticotropin-releasing factor in the median eminence. *Neuroendocrinology* 49: 255–261.
- Bhatnagar S, LT y Vining C**. 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.
- Booth DT, BE, MJ, y Lanyon JM**. 2004. The influence of incubation temperature on post-hatching fitness characteristics of turtles. *Int Congr Ser* 1275: 266–233.
- Boyle LM**. 2013. A Neuroplasticity hypothesis of chronic stress in the basolateral amygdale. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 86 (2): 117–125.
- Chacón D, SJ, CJ y Ash J**. 2007. *Manual para el manejo y la conservación de las tortugas marinas en Costa Rica; con énfasis en la operación de proyectos en playa y viveros*. Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE). Gobierno de Costa Rica. San José. 103 pp.
- Chen Cárdenas S M; Mayer N; Romanini M C; Rolando A N; Liaudat A C; Brun N; Vivas A; Gauna H F y Rodríguez N**. 2013. Reproductive response in offspring male rats exposed to prenatal stress and to early postnatal stimulation. *Int. J. Morphol* 31(2): 754–764.
- Chrousos GP**. 1998. Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptive response. In: *Csermely P (editor). Stress of life: from molecules to man. Ann. N.Y. Acad Sci* 851: 311–335.
- Denardo y Lighr P**. 1993. Effects of corticosterone on social behavior of male lizard. *Hormones and Behavior* 27: 184–199.
- Denver JR**. 2009. Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology* 164: 20–31.
- Donaldson EM**. 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.
- Dutton DL, Dutton PH, Chaloupka M, Boulon RH**, 2005. Increase of a Caribbean leatherback turtle population linked to long-term nest protection. *Biological Conservation* 126, 186–194.
- Eckert KL y Eckert SA**. 1990. Embryo mortality and hatch success *in situ* and translocated leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea* eggs. *Biological conservation* 53 (1): 37–46.
- Eckert KL, KAB, FAA y Donnelly M**. 1999. *Research and management techniques for the conservation of sea turtles (IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group publication no 4)*. Washington, D.C. (1725 De Sales Street, NW #600, Washington 20036): IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group.
- Glen F, Broderick AC, Godley BJ, Hays GC**. 2005. Patterns in the emergence of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) turtle hatchlings from their nests. *Marine Biology* 146: 1039–1049.
- Greenberg N y Wingfield JC**. 1987. Stress and reproduction: Reciprocal relationships. In Norris DO y Jones RE (eds), *Reproductive Endocrinology of Fishes, Amphibians and Reptiles*. Wiley, New York. P. 389–426.
- Greenberg N**. 2002. Ethological Aspects of stress in model lizard *Anolis carolinensis*. *Integ and Comp Biol* 42: 526–540.
- Gregory LF y Schmid JR**. 2001. Stress Responses and Sexing of Wild Kemp's Ridley Sea Turtles (*Lepidochelys kempii*) in the Northeastern Gulf of Mexico. *General and Comparative Endocrinology* 124(1): 66–74.
- Jessop TS y Hamann M**. 2005. Interplay between age class, sex and stress response in green turtles (*Chelonia mydas*). *Australian Journal of Zoology* 53(2): 131–136.
- Kapoor A y Matthews SG**. 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.
- Kim JJ y Yoon KS**. 1998. Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends in Neurosciences* 21: 505–509.
- Koch V, NW, JP, SH, y De La Toba V**. 2006. Estimates of sea turtle mortality from poaching and by catch in Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. *Biol Conserv* 128: 327–334
- Koshibu K, y Levitt P**. 2007. Gene x times environment effects: stress and memory dysfunctions caused by stress and gonadal factor irregularities during puberty in control and TGF- α hypomorphic mice. *Neuropsychopharmacology* 33(3): 557–565.
- Limpus CJ, BV y Miller JD**. 1979. Movement induced mortality of loggerhead eggs. *Herpetologica* 35: 335–338.
- Mandyam CD, CEF, EAJ, RCL y Richardson HN**. 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.
- Marcovaldi MA y Laurent A.** 1996. A six season study of marine turtle nesting at Praia do Forte, Bahia, Brazil, with implications for conservation and management. *Chelonian Conservation and Biology* 2 (1): 55-59.
- McAllister K.** 2000. Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cerebral Cortex* 10: 963–973.
- McElroy Mandi.** 2009. *The effect of screening and relocation on hatching and emergence success of loggerhead sea turtle nests at Sapelo Island, Georgia.* Tesis de Maestría. B. S. F. R. University Of Georgia. Athens, Georgia. pp 40.
- Mitra R, JS, MBS, VA y Chattarji S.** 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(26): 9371–9376.
- Moorreale SJ, GJ Ruiz, JR Spotila y EA Standora.** 1982. Temperature dependent sex determination: current practices, threaten conservation of sea turtles. *Science* 216: 1245-1247.
- Morales-Medina JC, Sanchez F, Flores G, Dumont Y, y Quirion R.** 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.
- Mrosovsky N y Yntema L.** 1980. Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: Implications for conservation practices. *Conservation Biology* 18: 271–280.
- Mrosovsky N.** 2008. Against over simplifying the issues on relocating turtle eggs. *Environmental Management* 41: 465–467.
- Mulder EJ, HPG, RA, CHB, RH, VB, JKB, Visser GHA.** 2002. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the unborn child. *Early Human Development* 70: 3–14.
- Osadchuk LV, BOB y Bakken M.** 2000. Influence of prenatal stress on steroidogenesis in gonads of blue foxes. *Russ j of Dev Biol* 31(3): 181-185.
- Özdemir BA y Türkozan O.** 2006. Carapacial scute variation in green turtle *Chelonia mydas* hatchlings in Northern Cyprus. *Turkish Journal of Zoology* 30 (2): 141–146.
- Parmenter CJ.** 1980. Incubation of the eggs of the green sea turtle, *Chelonia mydas*, in Torres Strait, Australia: the effect of movement on hatchability. *Aust Wild Res* 7: 487–491.
- Phillot AD y Parmenter CJ.** 2012. Anti-fungal properties of sea turtle cloacal mucus and egg albumen. *Marine Turtle Newsletter* 134: 17–21.
- Pintus KJ, BJ, GAM y Broderick NC.** 2009. Impact of clutch relocation on green turtle offspring. *The Journal of Wildlife Management* 73 (17): 1151–1157.
- Pottinger TG y Carrick TR.** 2000. Indicators of reproductive performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) selected for high and low responsiveness to stress. *Aquaculture Research* 31: 367–375.
- Reece SE, ACB, BJG y West SA.** 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.
- Rees AF, ET y Margaritoulis D.** 2002. Conservation activities for the protection of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in Kyparissia Bay during 2001. *Testudo* 5: 45–54.
- Rodríguez N, Mayer N y Gauna FH.** 2007. Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity. *Biocell* 31(1): 67-74
- Schreck CB, WCS y Fitzpatrick MS.** 2001. Effects of stress on fish reproduction gamete quality and progeny. *Aquaculture* 197: 3–24.
- Sönmez Bekta, Cemal Turan, Sükran Yalçın Özdişlek.** 2011. The effect of relocation on the morphology of Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), hatchlings on Samanda beach, Turkey (*Reptilia: Cheloniidae*) *Zoology* 52: 29–38.
- Stewart MG, DHA, SCK, IVR, VV B, CJ y Popov VI.** 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.
- Tannahill LA, SWJ, RI, CAF y Fink G.** 1991. Corticotrophin-releasing factor-41, vasopressin and oxytocin release into hypophysial portal blood in the rat: Effects of electrical stimulation of the hypothalamus, amygdala and hippocampus. *J. Endocrinol* 129: 99–107.
- Ulrich-Lai YM, Helmer F Figueiredo, Michelle M Ostrander, Dennis C Choi, William C Engeland, y James P Herman.** 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: 965–973.
- Vyas AL, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S.** 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22(15):6810–6818.
- Wood GE, Young LT, Reagan LP, Chen B y McEwen BS.** 2004. Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(11): 3973–3978.

XI. CAPÍTULO III

Efectos de la retención de neonatos post-emergentes de tortuga marina sobre la regulación del eje hipotalámico–hipofisiario-interrenal

Ma. Antonia Herrera Vargas¹, Esperanza Meléndez Herrera^{1*}, Gabriel Gutiérrez Ospina², Fany Edith Bucio Piña¹, Armida Báez Saldaña² and Alma Lilia Fuentes Farías^{1*}

¹ Laboratorio de Eco-Fisiología Animal, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA), UMSNH, Av. San Juanito Itzicuaró s/n, colonia Nueva Esperanza, C.P. 58337, Morelia, Michoacán, México.

² Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas Sede I, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tercer Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

*Correspondencia

Alma L. Fuentes F.

almafuentes70@hotmail.com

Esperanza Meléndez H.

esperanzamelendezherrera@hotmail.com

1 **Resumen**

2 La retención de crías de tortugas marinas
3 durante varias horas desde el momento de
4 su emergencia del nido y hasta el
5 amanecer, es una técnica implementada en
6 los viveros de conservación de estos
7 organismos. Esta práctica brinda

8 beneficios económicos a los gerentes de
9 los criaderos al cobrar por la asistencia a
10 los eventos de liberación de neonatos de
11 tortugas. Desafortunadamente, dicha
12 práctica podría promover una exposición
13 crónica post-emergencia al estrés durante
14 la etapa de frenesí, fundamental para la

15 supervivencia de los organismos. Nuestros
16 resultados evidencian que las crías
17 incubadas de manera natural mostraron
18 serias consecuencias sobre todo en la
19 disminución del peso corporal y la
20 reducción del despliegue del caparazón, lo
21 que podría sugerir el desgaste y utilización
22 de las reservas vitelinas. Así mismo, las
23 tortugas mostraron sobre-activación del eje
24 hipotalámico-hipofisiario-interrenal (HPI,
25 por sus siglas en inglés: hypothalamic-
26 pituitary-interrenal axis) evidenciada
27 mediante elevados niveles de
28 corticosterona a las 12 horas de retención.
29 Con base en nuestros resultados,
30 recomendamos que se realicen más
31 estudios del impacto de la retención de
32 crías y se considere replantear esta
33 estrategia de conservación.

34

35 **Palabras clave:** *Estrés, crías de L.*

36 *olivacea, niveles séricos de*

37 *corticosterona, respuestas al estrés,*

38 *Barra de Pichi.*

39

40 **Introducción**

41 Durante varias décadas, los proyectos de
42 conservación de tortugas marinas se han
43 enfocado a los primeros estadios de la vida
44 de estos vertebrados. La reubicación de los
45 huevos a viveros y su incubación en nidos
46 hechos por el hombre (NHH) son las
47 principales técnicas de conservación a
48 nivel mundial. Dichos esfuerzos requieren
49 de inversiones significativas de recursos
50 humanos y financieros, así como de la
51 participación de las comunidades locales.

52

53 Una vez que las crías emergen de los NHH,
54 evento que ocurre durante la noche-
55 madrugada, éstas son retenidas durante
56 horas hasta que los turistas pueden

57 trasladarse al vivero para ser testigos de la
58 liberación, lo que constituye una atracción
59 para el turismo. Se ha reportado que crías
60 retenidas en el vivero durante 6 horas
61 muestran una reducción de cerca del 50%
62 en la condición corporal, al ser comparadas
63 con las recién emergidas del nido, lo cual
64 reduce la capacidad de dispersión fuera de
65 la costa (Van de Merwe *et al.*, 2013). Esta
66 menor talla corporal, podría también ser
67 promovida a la exposición crónica post-
68 emergencia al estrés asociado a la
69 retención durante el “periodo de frenesí”,
70 un estado fisiológico natural de estrés
71 agudo caracterizado por una alta actividad
72 motriz orientada a alcanzar e internarse en
73 mar abierto y alejarse de la zona de mayor
74 depredación (Dial, 1987; Wyneken y
75 Salmon, 1992).

76

77 El estrés representa una interacción entre
78 estímulos físicos y/o mecánicos que
79 comprometen la homeostasis del
80 organismo (estresores), y la respuesta del
81 eje Hipotálamo-Hipofisiario-Adrenal
82 (HPA, por sus siglas en inglés,
83 hypothalamic-pituitary-adrenal axis).
84 Cuando un estresor es percibido por los
85 sistemas sensoriales, se envía una señal al
86 hipotálamo, el cual libera la hormona
87 corticotropina capaz de estimular a la
88 hipófisis. Esta glándula a su vez libera
89 adrenocorticotropina (ACTH, por sus
90 siglas en inglés: adrenocorticotropic
91 hormone) dirigida hacia la glándula
92 adrenal (para mamíferos) o inter-renal (en
93 el caso de reptiles), para liberar
94 glucocorticoides (GCs, como el cortisol o
95 corticosterona). Los GCs tienen múltiples
96 efectos, los cuales son mediados por dos
97 receptores citoplasmáticos diferentes:
98 receptor de glucocorticoides (GR, por sus

99 siglas en inglés: glucocorticoid receptor o
100 Tipo I) y receptor de mineralocorticoides
101 (MR, por sus siglas en inglés:
102 mineralocorticoid receptor o Tipo II).
103 Tanto los GR como los MR actúan como
104 factores de transcripción activados por
105 ligando, modificando la expresión de un
106 gran número de genes. El MR tiene una
107 afinidad muy alta por los GCs y regula los
108 ritmos secretores circadianos y la
109 pulsatilidad ultradiana. A su vez, cuando
110 hay niveles de estrés y aumentan los GC,
111 estos se unen de manera importante a GR,
112 lo cual es necesario para la inhibición de
113 respuestas al estrés (Myers *et al.*, 2012).
114
115 El cese de la liberación de los GCs es
116 controlada a través de retroalimentación
117 negativa. Las concentraciones elevadas de
118 GC interactúan con sus receptores en el
119 cerebro para desactivar los pasos iniciales
120 del eje HPA, por lo que los niveles de GCs
121 disminuyen aunque el estresor continúe
122 (Jacobson y Sapolsky, 1991; Herman *et*
123 *al.*, 2003; 2005).
124
125 La duración y/o la magnitud de la
126 liberación de GCs son indicadores de la
127 condición física de los organismos. Los
128 niveles de GCs en el tiempo reflejan las
129 interacciones hormona-receptor que
130 ocurren durante todo el curso de la
131 respuesta al estrés, no justo en el pico de la
132 liberación de GCs. Las respuestas
133 fisiológicas hormonales apropiadas al
134 estrés son importantes para la
135 supervivencia (Ulrich-Lai *et al.*, 2006).
136
137 Por consiguiente, en el presente estudio,
138 evaluamos las respuestas al estrés asociado
139 a la retención post emergencia de las crías
140 de tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

141 A modo de obtener un panorama sobre la
142 fisiología del estrés que despliegan los
143 organismos provenientes de NN frente a
144 los NHH.

145

146 **Metodología**

~~147~~

149 *Sitio de estudio y condiciones de* 150 *incubación*

151 El presente proyecto se llevó a cabo
152 durante la temporada reproductiva de
153 2013. Las crías de *L. olivacea* fueron
154 incubadas en nidos naturales (NN) de la
155 playa "Barra de Pichi" Municipio de
156 Lázaro Cárdenas, Michoacán, México
157 (Fig. 1) y nidos hechos por el hombre
158 (NHH) del vivero "La Tortuga" (17 °
159 58'23.86 "N. 102 ° 19'24.63" O. 7 pies de
160 altitud. Google Earth image @ 2016 Globo
161 digital @Google. Fig. 2). La translocación
162 de los huevos y la resiembra en el NHH
163 fueron realizados por personal del
164 criadero, el cual siguió los protocolos
165 recomendados por la norma oficial
166 mexicana (NOM-162-SEMARNAT-2011,
167 [http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php](http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5233078)
168 [?codigo=5233078](http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5233078)).

169

170 Brevemente, el personal del criadero
171 patrulló la playa por la noche para
172 identificar a las hembras desovando.
173 Posteriormente, una vez concluida la
174 oviposición y el abandono del nido por la
175 hembra se retiró cuidadosamente la arena
176 y recolectaron todos los huevos. Estos
177 fueron trasladados al vivero en bolsa de
178 plástico, y la nidada completa fue
179 enterrada con arena húmeda seguida de
180 arena seca dentro del NHH. En todo
181 momento se hicieron esfuerzos para evitar
182 la rotación de los huevos. La translocación
y re-entierro de los huevos no tomó más de

183 dos horas. Durante la misma colecta se
184 identificaron y resguardaron los NN
185 sembrados cerca del vivero, a la misma
186 distancia de la línea de marea (80 metros.
187 Fig. 2). Tanto los NN como los NHH
188 fueron resguardados utilizando una malla
189 de alambre.

191 *Colecta de las crías*

192 Todos los neonatos utilizados para el
193 análisis morfológico y / o bioquímico en el
194 momento de la emergencia o posterior a la
195 retención, se obtuvieron de los mismos
196 nidos.

198 Dieciocho neonatos de NN (n = 3) y
199 dieciocho de NHH (n = 3) fueron
200 capturados al azar justo al momento de la
201 emergencia del nido y transferidos a tinas
202 de plástico, en las cuales permanecieron 12
203 horas.

205 Una vez cumplido el tiempo de retención,
206 las crías fueron pesadas en una báscula de
207 precisión tubular romana (Pesola, Light-
208 Line Spring Scale, 50g), y sus longitudes
209 (hocico-cloaca, largo y ancho del
210 caparazón y plastrón) fueron medidas
211 usando un Vernier digital (Mitutoyo).
212 Entonces las crías fueron decapitadas
213 rápidamente y su sangre colectada en tubos
214 de microcentrífuga. Posteriormente, el
215 corazón se expuso mediante la eliminación
216 de los escudos pectorales, recolectando
217 muestras de sangre adicionales mediante
218 punción cardíaca directa. La sangre de
219 ambas colectas fue reunida en el mismo
220 vial.

222 Los protocolos de manipulación, sacrificio
223 y muestreo fueron aprobados por el Comité
224 de Derechos de los Animales de la

225 SEMARNAT, bajo el número de licencia
226 SGPA / DGVS / 05459/13, y de acuerdo
227 con la Norma Oficial Mexicana 033-ZOO-
228 1995 para el sacrificio humanitario de
229 animales domésticos y salvajes.

231 *Niveles séricos de corticosterona*

232 El suero sanguíneo de cada organismo fue
233 obtenido por centrifugación en una
234 microcentrífuga portátil
235 (ThermoScientific) durante 15 minutos a
236 2,000 rpm, a temperatura ambiente. Las
237 muestras se almacenaron en nitrógeno
238 líquido en el sitio de colecta y se
239 transportaron al laboratorio, donde fueron
240 mantenidas a -80 ° C hasta su posterior
241 procesamiento. Los niveles de
242 corticosterona se midieron usando un
243 estuche de inmunoabsorbencia ligada a
244 enzimas (ALPCO, 55-CORMS-E01),
245 siguiendo las instrucciones del fabricante.
246 El coeficiente de variación intraensayo fue
247 2.8-8.3% y la sensibilidad del ensayo fue
248 4.1ng /mL.

250 *Análisis estadísticos*

251 Los datos de todas las variables en los dos
252 grupos de animales experimentales
253 presentaron una distribución normal y
254 homogeneidad de varianza (Kolmogorov-
255 Smirnov test, $\alpha > 0.05$), a excepción del
256 peso corporal.

258 Se realizó un análisis de varianza anidado
259 (ANOVA) para comparar las variables
260 morfométricas entre los tiempos y entre los
261 grupos de crías provenientes de un nido
262 dentro de los tratamientos. Para llevar a
263 cabo estos análisis, utilizamos un modelo
264 lineal generalizado (MLG) para los datos
265 normales y un modelo no lineal

266
267 generalizado (MNLG) para el peso
268 corporal.

269
270 Para comparar los niveles séricos de
271 corticosterona en los diferentes tiempos
272 (emergencia y retención) y entre los
273 tratamientos (NN y NHH), se realizó un
274 ANOVA anidada en grupos (el número de
275 nido), dentro de los tiempos de muestreo o
276 tratamientos

277
278 Posteriormente, se realizaron pruebas *post*
279 *hoc* de comparación múltiple de Fisher
280 LSD, con un nivel confianza del 95% ($\alpha \leq$
281 0.05), para identificar diferencias
282 significativas entre los grupos.

283 Se utilizó el software Statistica 7 para
284 todos los análisis.

285 **Resultados**

286

287 **Medidas Macroscópicas**

288

289 ***Peso de crías de L. olivacea***

290 Los resultados muestran que la retención
291 durante 12 horas disminuye la masa
292 corporal tanto de las crías provenientes de
293 NN como aquéllas de NHH, con respecto a
294 la emergencia.

295

296 Las crías retenidas de nidos naturales (NN)
297 redujeron significativamente su peso
298 (15.40 ± 0.35 g), al mismo nivel que las
299 crías de nido hecho por el hombre
300 emergentes (NHH, 15.84 ± 0.43 g), y NHH
301 retenidas (15.38 ± 0.40 g) frente a las crías
302 NN emergentes (17.02 ± 0.17 g. Nested
303 ANOVA, $W X^2(4) 22.075$, $<p=0.05$. Fig.
304 3).

305

306 ***Medidas de caparazón y plastrón de crías*** 307 ***de L. olivacea***

308 Los resultados morfológicos revelaron que
309 las crías emergentes y retenidas
310 provenientes de NHH presentaron un
311 caparazón más ancho (35.06 ± 0.25 y 35.05
312 ± 0.38 mm, respectivamente) respecto de
313 las crías retenidas provenientes de NN
314 (33.68 ± 0.40 cm, Fig. 4. ANOVA anidada,
315 $F(6, 60) = 2.7154$, $*p=0.02121$. El resto de
316 las variables morfométricas analizadas
317 (longitud ocico-cloaca, longitud y ancho
318 de caparazón, así como longitud de
319 plastron) no mostraron diferencias
320 significativas.

321

322 **Niveles séricos de corticosterona de** 323 ***crías de L. olivacea***

324 No se encontraron diferencias
325 significativas en los niveles séricos de
326 corticosterona en las crías de NHH en los
327 dos momentos evaluados (Emergencia,
328 30.96 ± 1.57 ng/mL y retención, $29.59 \pm$
329 1.44 ng/mL. Fisher LSD means
330 comparison test, $p=0.3107$). Contrario a lo
331 observado en las crías de NN, las cuales
332 mostraron diferencias significativas en los
333 niveles séricos de corticosterona en los
334 diferentes eventos evaluados (Emergencia,
335 27.27 ± 0.79 frente a retención, $30.76 \pm$
336 1.40 ng/mL. Fisher LSD means
337 comparison test, $*p=0.0467$). Fig. 5.
338 ANOVA anidada: $F(6, 48) = 3.3894$,
339 $p=0.00722$).

340

341 **Discusión**

342

343 El expolio y re-entierro de los huevos de
344 tortugas marinas, así como la retención de
345 crías tras su emergencia del nido, son
346 técnicas de conservación que atraen al
347 turismo hacia las playas de anidación. En
348 el momento en que las crías emergen del
349 nido presentan una fase de estrés agudo

350 conocido como “periodo de frenesí”,
351 caracterizado por la gran actividad motriz
352 que les permite recorrer, en cuestión de
353 minutos, la distancia necesaria para
354 alcanzar la costa y adentrarse en mar
355 abierto (Dial, 1987; Wyneken y Salmon,
356 1992). Sin embargo, la retención de las
357 crías deteriora su rendimiento locomotor a
358 las 6 (Van de Merwe *et al.*, 2013) y 48
359 horas de retención (Mejías y Bride, 2016),
360 posiblemente, debido al desgaste de
361 recursos energéticos importantes. El estrés
362 es una condición que altera la homeostasis
363 del organismo y moviliza los recursos
364 energéticos. Con el objetivo de evaluar si
365 la retención impone un reto en los
366 organismos capaz de alterar la función del
367 eje HPI, obtuvimos un grupo de crías al
368 momento justo de la emergencia del nido y
369 otro grupo que retuvimos durante 12 horas.
370 Adicionalmente, este trabajo evaluó el
371 efecto de la incubación en NHH sobre la
372 regulación del eje HPI. Los resultados
373 evidencian que la retención tiene un
374 importante efecto en los organismos de los
375 NN, en particular disminuyendo el peso
376 corporal y con tendencia a disminuir el
377 despliegue del caparazón. Esto sugiere el
378 desgaste y utilización de las masas del
379 vitelo. Los resultados también muestran
380 una activación del eje HPI, evidenciado
381 por niveles superiores de corticosterona
382 tras la retención de 12 h. En conjunto, los
383 resultados obtenidos sugieren que dicho
384 evento de retención produce una respuesta
385 de estrés, cuyos efectos podrían ser
386 potencialmente negativos.

387
388 En el caso de las crías de NHH recién
389 emergidas y retenidas se presentaron bajos
390 pesos y el despliegue del caparazón que
391 sobresale en magnitud, respecto de las

392 crías de NN. En el caso particular de las
393 tortugas la mayoría de la energía utilizada
394 por los fetos para crecer se asigna en la
395 yema (Hewavisenthi y Parmenter, 2002;
396 Venkatesan *et al.*, 2005). De hecho, la
397 masa de la yema contribuye positivamente
398 al peso de las crías (Wallace *et al.*, 2006).
399 Por lo tanto, es posible que el peso corporal
400 reducido observado en las crías de NHH
401 pueda ser el resultado de la pérdida de la
402 masa del huevo o de algunos de sus
403 componentes (la masa de la yema y/o
404 albúmina), como efecto del estrés. No
405 obstante, en este trabajo no evaluamos
406 dichos parámetros con la intención de
407 reducir al máximo las posibles fuentes de
408 estrés en los organismos. Por lo tanto,
409 debemos plantearnos diversos
410 experimentos futuros donde se evalúe si la
411 incubación NHH disminuye la masa del
412 vitelo de las crías y / o si cambia su
413 composición bioquímica. Para poder
414 comprender los cambios sobre el
415 caparazón será útil estudiar los patrones de
416 expresión de genes que están involucrados
417 en la modulación del desarrollo del
418 caparazón (p. ej., el factor de transcripción
419 miogénica. Kawashima-Ohya *et al.*, 2006),
420 y el factor de crecimiento del hepatocito
421 (Kawashima-Ohya *et al.*, 2011).

422
423 Los niveles iniciales de corticosterona de
424 los organismos de NHH evidencian que
425 emergen con sobre-activación del eje HPI,
426 como efecto de las prácticas asociadas a
427 este tipo de incubación. Adicionalmente,
428 dicha sobre-activación de la respuesta de
429 estrés impide observar los efectos de la
430 retención. Debido a que es bien conocido
431 en mamíferos que los eventos adversos,
432 durante los estadios tempranos del
433 desarrollo, genera modificaciones

434 permanentes en la función del eje HPA,
435 presentándose persistentes alteraciones en
436 los niveles plasmáticos hormonales de
437 glucocorticoides (Donaldson, 1981;
438 Pottinger y Carrick, 1999; Schreck *et al.*,
439 2001; Bhatnagar *et al.*, 2005), como la
440 corticosterona. En consecuencia, han sido
441 observadas afectaciones en la función
442 cognitiva, y reproductiva, entre otras,
443 reflejándose, por lo tanto, la importancia
444 del mantenimiento de un óptimo
445 funcionamiento y respuestas adecuadas en
446 los niveles de las respuestas al estrés
447 (Chrousos y Gold, 1992).

448
449 En conclusión, los altos niveles de
450 corticosterona presentados por las crías
451 tras su retención de 12 horas, en
452 comparación con aquéllos presentados a la
453 emergencia, sugieren que la retención es
454 un potente estresor en el caso de tortugas
455 incubadas en NN. Por el contrario, las crías
456 de NHH no presentan esta conducta debido
457 a que desde su emergencia muestran
458 niveles superiores.

459 **Conflictos de interés**

460 Todos los autores declaran que no tienen
461 ningún conflicto de intereses.

462 **Contribución de los autores**

463
464 MH, FB, y AB llevaron a cabo
465 experimentos y analizaron los datos. MH,
466 EM, GG y AF interpretaron los resultados
467 y escribieron el manuscrito. EM, GG y AF
468 diseñaron experimentos y obtuvieron
469 fondos. Todos los autores revisaron y
470 aprobaron la versión final del manuscrito.

471 **Fondos**

472
473 Este trabajo fue apoyado por subvenciones
474 del Consejo Nacional de Ciencia y

475 Tecnología (CONACYT no. 180762 de
476 EM y no. 258747 de AF). Se otorgaron
477 fondos adicionales mediante donaciones
478 de la Coordinación de la Investigación
479 Científica a EM y AF. MH y FB becarias
480 de doctorado y maestría de CONACYT
481 (CVU 257690 y 738354).

482 **Agradecimientos**

483
484 A los biólogos Edel Pineda López y
485 Alejandra Castellón por su valiosa ayuda
486 para el muestreo.

487 **Literatura citada**

- 488
489 Bhatnagar, S., Lee, T. M., Vining, C.
490 (2005). Prenatal stress differentially
491 affects habituation of corticosterone
492 responses to repeated stress in adult
493 male and female rats. *Horm. Behav.* **47**,
494 430–438.
495
496 Dial, B. E. (1987). Energetics and
497 performance during nest emergence and
498 the hatchling frenzy in loggerhead sea
499 turtles (*Caretta caretta*). *Herpetol.* **43**,
500 307-315
501 Donaldson, E. M. (1981). The Pituitary-
502 interrenal axis as an indicator of Stress
503 in fish. En: Stress and fish. AD
504 Pickering (Ed). Academic Press,
505 London, pp. 11-47.
506 Herman, P. J., Ostrander, M. M., Muller,
507 N. K. and Figueiredo, H. (2005).
508 Limbic system mechanism of stress
509 regulation: Hypothalamo-pituitary-
510 adrenocortical axis. *Prog.*
511 *Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.*
512 **29**, 1201-1213.
513 Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N.
514 K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M.,
515 Choi, D. C. and Cullinan, W. E. (2003).
516 Central mechanisms of stress
517 integration: hierarchical circuitry

518 controlling hypothalamo–pituitary–
519 adrenocortical responsiveness. *Front.*
520 *Neuroendocrinol.* **24**, 151–180.

521 Jacobson, L., and Sapolsky, R. M. (1991).
522 The role of the hippocampus in
523 feedback regulation of the
524 hypothalamo-pituitary-adrenocortical
525 axis. *Endocr. Rev.* **12**, 118– 134.

526 Kawashima-Ohya, Y., Narita, Y.,
527 Nagashima, H., Usuda, R., and
528 Kuratani, S. (2011). Hepatocyte growth
529 factor is crucial for development of the
530 carapace in turtles. *Evol. Dev.* **13**, 260–
531 268. Doi: 10.1111/j.1525-
532 142X.2011.00474.x.

533 Kawashima-Ohya, Y., Usuda, R., Kuraku,
534 S., Nagashima, H., and Kuratan S.
535 (2006). Unique features of Myf-5 in
536 turtles: nucleotide deletion, alternative
537 splicing, and unusual expression pattern.
538 *Evol. Dev.* **8**: 5, 415–423.
539 [https://doi.org/10.1111/j.1525-](https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.00115.x)
540 [142X.2006.00115.x](https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.00115.x)

541 Mejías, B. C., y Bride, I. (2016). Assessing
542 the impacts of hatcheries on green turtle
543 hatchlings. *Marine Turtle Newsletter.*
544 **151**, 16-21.
545 [http://www.seaturtle.org/mtn/archives/](http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn151/mtn151-4.shtml)
546 [mtn151/mtn151-4.shtml](http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn151/mtn151-4.shtml)).

547 Pottinger, T. G. and Carrick, T. R. (2000).
548 Indicators of reproductive performance
549 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*
550 (Walbaum) selected for high and low
551 responsiveness to stress. *Aquacult. Res.*
552 **31**, 367-375.

553 Romero, L. M. (2004). Physiological stress
554 in ecology: lessons from biomedical
555 research. *Trends. Ecol. Evol.* **19** (5),
556 249-255.

557 Schreck, C. B., Contreras-Sánchez, W. and
558 Fitzpatrick, M. S. (2001). Effects of
559 stress on fish reproduction gamete
560 quality, and progeny. *Aquacult.* **197**, 3-
561 24.

562 Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F.,
563 Ostrander, M. M., Choi, D. C.,
564 Engeland, W. C. and Herman, J. P.
565 (2006). Chronic stress induces adrenal
566 hyperplasia and hypertrophy in a
567 subregion-specific manner. *Am. J.*
568 *Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**, 965–
569 973.

570 Van de Merwe, J. P., Ibrahim, K. and
571 Whittier, J. (2013). Post-emergence
572 handling of green turtle hatchlings:
573 Improving hatchery management
574 worldwide. *Anim. Conserv.* **16**, 316–
575 323.

576 Venkatesan, S., Kannan, P., Rajagopalan,
577 M., and Vivekanandan, E. (2005).
578 Embryonic energetics in the egg of the
579 green turtle *Chelonia mydas*. *J. Mar.*
580 *Biol. Ass. India.* **47** (2), 193 – 197.

581 Wallace, B. P., Sotherland, P. R., Tomillo,
582 P. S., Bouchard, S. S., Reina, R. D.,
583 Spotila, J. R., Paladino, F. V. (2006).
584 Egg components, egg size, and
585 hatchling size in leatherback turtle.
586 *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol.*
587 *Integr. Physiol.* **145**, 524 – 532.
588 Doi:10.1016/j.cbpa.2006.08.040.

589 Wyneken, J., and Salmon, M. (1992).
590 Frenzy and post frenzy swimming
591 activity in Loggerhead, Green, and
592 Leatherback hatchling sea turtles.
593 *Copeia.* **1992** (2), 478 - 484. Doi:
594 10.2307/1446208.

595

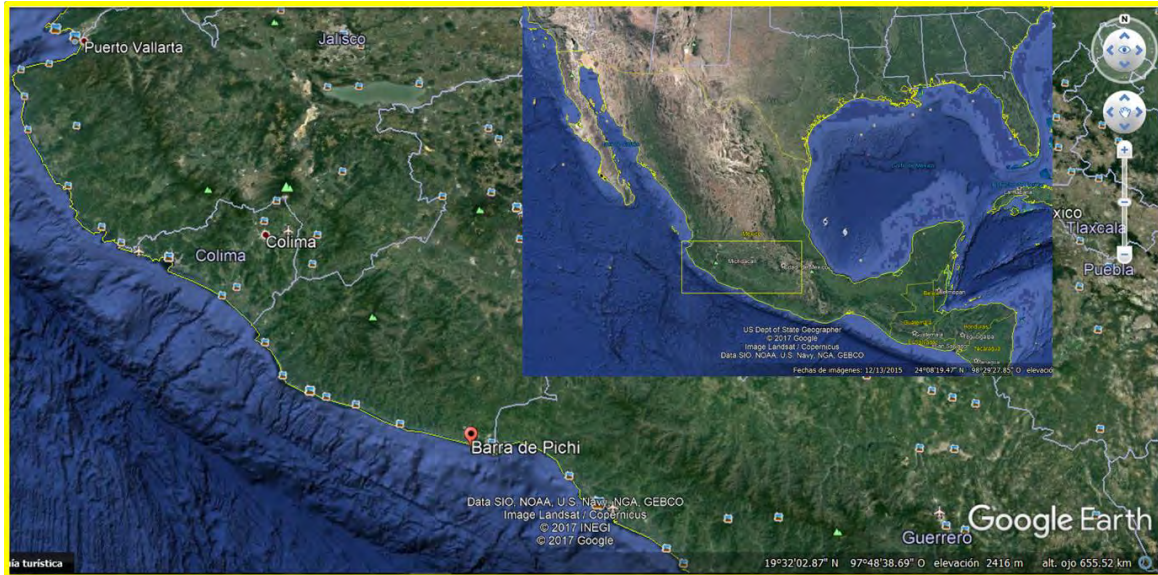


Figura 1. Mapa geográfico del sitio de estudio. Fotografías satelitales (Google Earth) de México (a menor aumento) y Michoacán (recuadro amarillo, a mayor aumento) que muestran la ubicación de Barra de Pichi.

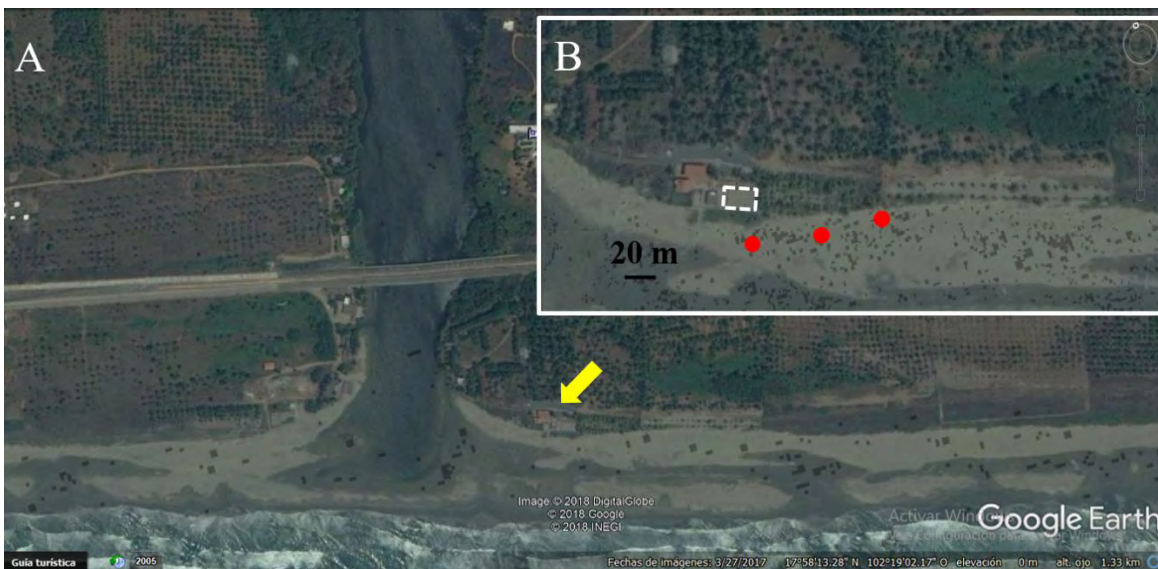


Figura 2. Sitio de Estudio. Fotografías satelitales (Google Earth) a mayor aumento (A) y a menor aumento (B), que muestran la ubicación del criadero de protección de tortugas (flecha amarilla en A) y la ubicación de nidos naturales y hechos por el hombre (puntos rojos y cuadrado discontinuo en B, respectivamente).

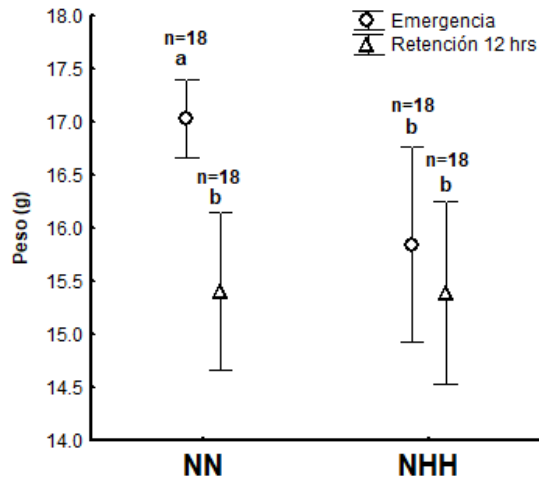


Figura 3. Las crías de *L. olivacea* mostraron una reducción en el peso corporal como efecto de la retención. El gráfico muestra que las crías retenidas de nidos naturales (NN) redujeron significativamente su peso respecto de las de NN a la emergencia. Las crías retenidas de nido hecho por el hombre (NHH) no mostraron diferencias significativas respecto de las NHH a la emergencia. Las crías NHH emergentes redujeron significativamente su peso respecto de las NN emergentes. Finalmente, las crías retenidas de NHH no mostraron diferencias significativas respecto de las crías retenidas NN. Los valores están representados como el promedio \pm la desviación estándar (DS). Letras diferentes enmarcan las diferencias entre los diferentes eventos (ANOVA anidada, $W X^2_{(4)} = 22.075, p = 0.00019$).

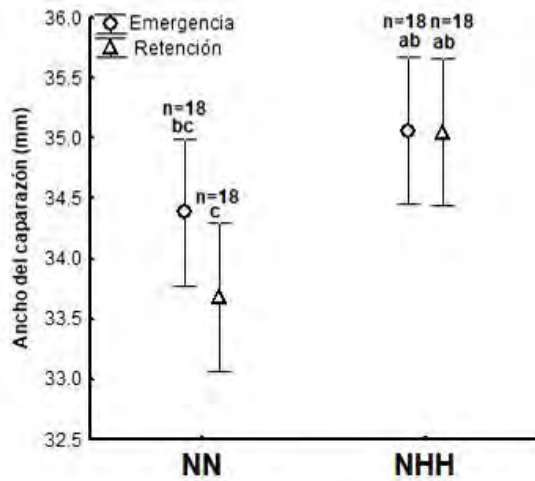


Figura 4. Las crías de *L. olivacea* emergidas y retenidas de incubación en nidos hechos por el hombre mostraron una mayor anchura del caparazón. El gráfico muestra la anchura promedio del caparazón de crías emergentes y retenidas que fueron incubadas bajo condiciones naturales (NN) vs nidos hechos por el hombre (NHH). Las crías NN retenidas redujeron significativamente el ancho de su

caparazón respecto de las NN al momento de su emergencia. Las crías retenidas NHH no mostraron diferencias significativas respecto de las NHH a su emergencia del nido. Las crías NHH emergentes no mostraron diferencias significativas en la anchura del caparazón respecto de las NN emergentes. Las crías retenidas NHH mostraron un aumento significativo en la anchura del caparazón respecto de las crías retenidas NN. Los valores se representan como el promedio \pm DS. Letras diferentes enmarcan las diferencias entre los diferentes eventos (ANOVA anidada: $F_{(6, 60)}=2.7154, p = 0.02121$).

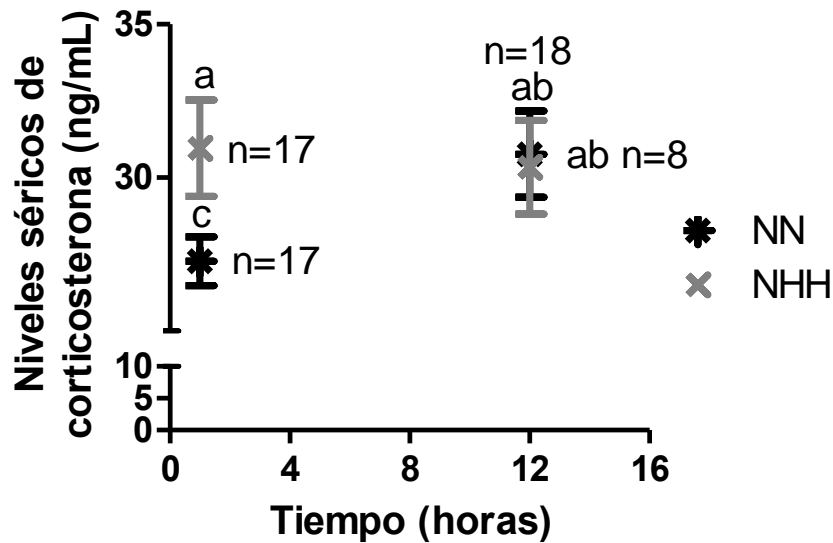


Figura 5. El gráfico muestra los niveles séricos de corticosterona en las crías de *L. olivacea* desde su emergencia y 12 horas después de haber sido retenidas de nidos naturales (NN) y nidos hechos por el hombre (NHH). La retención de crías de NN mostro un aumento significativo de los niveles séricos de corticosterona respecto de las crías a la emergencia del NN. Las crías retenidas de NHH no mostraron diferencias significativas en los niveles séricos de corticosterona respecto de la emergencia de crías de NHH. Las crías emergentes de NHH mostraron niveles significativamente superiores de corticosterona respecto de las crías emergentes NN. Finalmente, las crías retenidas NHH no mostraron diferencias significativas en los niveles séricos de corticosterona respecto de las crías retenidas NN. Los valores se representan como el promedio \pm ES. Letras diferentes enmarcan las diferencias entre los diferentes eventos (ANOVA anidada: $F_{(6, 48)}= 3.3894, p = 0.00722$).

XII. DISCUSIÓN GENERAL

Una de las principales acciones encaminadas a la conservación de las poblaciones de tortugas marinas a nivel global es la creación de viveros en dónde son reubicados e incubados la mayor cantidad de huevos recién ovipositados, para ser protegidos de las inundaciones, el consumo humano y depredación. Frecuentemente esta medida incluye la retención de las crías, por periodos máximos de 12 horas (Eckert y Eckert, 1990; Dutton, 2005). Sin embargo, el hecho de manipular y movilizar los huevos desde NN hasta el NHH dentro del vivero, conlleva a diversos retos para los organismos en desarrollo. Numerosos trabajos previos han mostrado diferencias en el ambiente incubatorio (Arzola-González, 2007; Reece *et al.*, 2002; Bézy *et al.*, 2014) y se han descritos efectos negativos de estas prácticas sobre el éxito de eclosión, la salud, la proporción de los sexos y modificaciones del fenotipo de los organismos que de ellos emergen (Glen *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2007). En el presente trabajo mostramos que la incubación de los embriones/fetos de tortuga marina en NHH, y la retención de neonatos, generan respuestas de activación del eje HPI similares a las reportadas en mamíferos ante una exposición crónica a estresores. Las crías de *L. olivacea* emergentes y retenidas de NHH, así como las retenidas de NN, presentaron pesos corporales más bajos respecto de las emergentes de NN. Las crías emergentes de NHH mostraron células hipertróficas productoras de glucocorticoides, en correspondencia con niveles basales incrementados de corticosterona respecto de las emergentes de NN. Adicionalmente, la retención constituye un estímulo estresor, demostrado por el aumento en los niveles de corticosterona por parte de los organismos de NN. En conjunto, estos resultados sugieren que las crías de NHH fueron expuestas al estrés durante el período de incubación. Debido a que el eje HPI comienza a funcionar el día 11 de incubación, los cambios morfológicos observados en las crías de NHH emergentes podrían predominantemente reflejar el estrés inducido por las condiciones de incubación, en lugar de las de la translocación. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que la translocación del huevo pueda haber condicionado la sobre-activación del eje HPI, posiblemente a través de mecanismos epigenéticos (Leigh, 2010). Es recomendable conducir estudios en donde sea evaluado, si las maniobras de reubicación contribuyen en las respuestas observadas.

En roedores, la exposición crónica al estrés en etapas prenatales está asociada a resultados negativos al nacimiento tales como la disminución de la tasa de crecimiento fetal (Brunton y Russell, 2010; Brunton, 2013), circunstancia que conduce a la reducción del peso corporal al nacimiento, aunada a una baja tasa de supervivencia. Al monitorear las crías de tortuga recién emergidas de los nidos, se encontró una menor masa corporal en los organismos que fueron incubados bajo las condiciones del NHH del vivero ($15.84 \text{ g} \pm 1.84$), respecto de las que emergieron de nidos naturales ($17.02 \text{ g} + 0.73$). Este resultado había sido previamente documentado en diversas especies de tortugas marinas, tanto en la especie de este estudio *L. olivacea* (Hill, 1971; Mast y Carr, 1989), como en *Chelonia mydas* (Sonmez *et al.*, 2011) y *Caretta caretta* (Turkozan *et al.*, 2013). De manera similar, en un estudio conducido para *L. olivacea* en viveros del Sur de Nayarit y Norte de Jalisco, sobre las costas del Pacífico mexicano, durante la temporada de anidación del 2013, se reporta un promedio de $16.3 \text{ g} \pm 1.6$ (Hart *et al.*, 2016), un gramo por debajo al que mostraron los organismos incubados bajo las condiciones naturales de Barra de Pichi, Lázaro Cárdenas, Michoacán, del presente estudio ($17.02 \text{ g} \pm 0.73$).

Para las tortugas marinas se sabe que, tanto el mayor peso, como el mayor tamaño corporal de la progenie, influyen de forma positiva en el desarrollo de los organismos, así como en la supervivencia en ambientes adversos (alta densidad de depredadores. Bustard, 1972). La progenie mayor exhibe un mejor rendimiento y son mejores nadadores (Burgess *et al.*, 2006; Van de Merwe *et al.*, 2013). Por lo tanto, la reubicación de los huevos de *L. olivacea* y su incubación en NHH tienen un efecto sobre la morfología de las crías y, en consecuencia, sobre la idoneidad de las mismas al medio ambiente natural.

En los mamíferos, el retraso en el crecimiento fetal, durante la exposición crónica al estrés, generalmente es consecuencia de la desnutrición prenatal, debida a la insuficiencia placentaria, un proceso mediado por mecanismos epigenéticos (Leigh, 2010). Sin embargo, en el caso de las tortugas, animales no placentarios, la mayor parte de la energía utilizada por los embriones/fetos para su crecimiento y desarrollo se asigna en la yema (Hewavisenthi y Parmenter, 2002;

Venkatesan *et al.*, 2005). De hecho, la masa de la yema, la masa de huevo y la masa de albúmina hidratada, se correlacionan positivamente con el peso de las crías al momento de la emergencia (Wallace *et al.*, 2006). Por lo tanto, es posible que el peso corporal reducido observado en las crías de recién emersión de los NHH pueda ser el resultado de pérdida de la masa de alguno de los componentes del huevo, como consecuencia de la exposición crónica al estrés que hemos aquí documentado. En este trabajo no se evaluaron los parámetros del huevo, con la finalidad de reducir al máximo las posibles fuentes de estrés, pero experimentos futuros deberían evaluarlos, así como la composición bioquímica del huevo, para entender los mecanismos involucrados en dicha disminución de peso de los neonatos. También será útil estudiar los patrones de expresión y metilación de genes que están implicados en la modulación del crecimiento fetal (por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos, Kawashima-Ohya *et al.*, 2011). A pesar de estas limitaciones, los efectos diferenciales que las condiciones de incubación en NHH tuvieron en diversos parámetros morfológicos y en los niveles séricos de corticosterona todavía respaldan la inferencia general de este trabajo, que el retraso en el crecimiento es debido a la exposición crónica al estrés asociada a la incubación en NHH.

La glándula suprarrenal en mamíferos, o glándula inter-renal en reptiles, “es un órgano esencial sensible al estrés, que es parte del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA ó HPI en reptiles) y del sistema simpático-adrenomedular” (Ulrich-Lai *et al.*, 2006). Existe evidencia que la exposición crónica al estrés suele aumentar el peso de dicha glándula. Este crecimiento puede deberse a la hiperplasia celular del tejido y/o a la hipertrofia de sus componentes, pero suele ser muy específica a una región o subregión en particular, dependiendo en parte del tipo de estímulo estresor o del contexto (por ej. intensidad y/o duración). Por ejemplo, Ulrich-Lai *et al.* (2006) determinaron un aumento en las respuestas máximas de corticosterona suprarrenal y plasmática, así como hiperplasia e hipertrofia de las zonas fasciculada y medular de la glándula adrenal asociada a la exposición dos veces al día (a las 9:30 y 15:00 h) a uno de varios factores de estrés, presentados en un orden impredecible (CVS, por sus siglas en inglés: chronic variable stress) durante 14 días, más la administración exógena de ACTH (0-895 ng / 100 g de peso corporal) en

ratas macho adultas bloqueadas con dexametasona. En conjunto, dichos hallazgos demostraron que el CVS y la estimulación con ACTH, indujeron el aumento de las respuestas máximas de corticosterona. No obstante, dicha estimulación, promovió la reducción del tamaño celular en la zona glomerulada. Estos cambios crónicos inducidos por el estrés sobre el crecimiento suprarrenal y la función demuestran que el aumento del peso suprarrenal después de CVS se produce a causa de la hiperplasia celular de las subregiones suprarrenales específicas.

En este trabajo, en las crías emergentes de *L. olivacea*, la hipertrofia de las células productoras de glucocorticoides y la hipoplasia del tejido interrenal fueron encontrados en los organismos de los NHH. Del mismo modo, para determinar si la incubación en los NHH proporcionó un ambiente estresante durante el desarrollo incubatorio, o si la retención proporcionó una exposición al estrés postnatal a las crías de tortugas golfinas, se extrajeron muestras séricas de organismos en el momento de la emergencia del nido, a la llegada al mar y tras su retención durante 12 horas, para cuantificar los niveles de corticosterona, tanto de organismos provenientes de NN como de NHH. Los resultados evidenciaron que los niveles séricos de corticosterona mostrados por las crías de NHH al momento de la emergencia del nido (31.15 ± 1.44 ng/mL), se asemejan a los máximos niveles derivados de la retención (29.59 ± 1.44 y 30.76 ± 1.40 ng/mL) de NHH y NN respectivamente. Resulta interesante notar que estos niveles de corticosterona concuerdan con aquellos reportados en: a) juveniles de tortuga lora (*L. kempii*), quienes muestran niveles de 24.68 ± 3.65 ng/mL, posterior a una hora de retención (Gregory y Schmid, 2001), y b) de organismos inmaduros de tortuga verde (*C. mydas*), quienes presentan niveles de 20 ng/mL, tras 3 y hasta 9 horas de retención (Jessop y Hemann, 2005), niveles que concuerdan con los que estamos detectando para los organismos provenientes de NN justo a la emergencia (27.30 ± 0.77 ng/mL). Estos datos adquieren relevancia si consideramos que la emergencia es un evento que requiere activación controlada del eje HPI, la que permite a los organismos salir del nido y llegar al mar, por lo que la emergencia como tal puede ser considerada como un estresor agudo. Así, los todavía más altos niveles de corticosterona que encontramos en los neonatos de *L. olivacea* que emergieron de NHH y los producidos tras la retención validan nuestra hipótesis de una función exacerbada del

eje HPI y condiciones crónicas al estrés. De igual importancia, la diferencia de la tasa de aumento de los niveles de corticosterona entre los grupos NN vs NHH en los momentos evaluados (emergencia vs llegada al mar y/o retención) muestran que los individuos de NHH no muestran un incremento en la respuesta de estrés, a diferencia de los organismos de NN, sugiriendo la alteración en la función del eje HPI en los organismos de los NHH.

En mamíferos, los niveles basales y los relacionados a las repuestas de estrés dependen de la integridad del eje HPA, que adicionalmente ejerce efectos profundos sobre la regulación de otros sistemas (inmune, endócrino y metabólico), con el objeto de orquestar una respuesta que permita resistir cualquier reto y preserve el medio interno (Kyrou y Tsigos, 2005). Aunado a lo anterior, los glucocorticoides juegan un papel fundamental en la adaptación de un organismo a eventos estresantes en su vida. Por consiguiente, las investigaciones han demostrado que las acciones de dichas hormonas a nivel molecular y celular son altamente complejas, con múltiples consecuencias a largo plazo sobre la fisiología y el comportamiento de los organismos. En este sentido, cabe destacar que el eje HPA está controlado por la retroalimentación negativa de los GC, que funcionan para rescindir las respuestas al estrés, por lo que, los niveles elevados de corticosterona en las crías de ratas expuestas prenatalmente al estrés, se propone que podrían ser debidos al deterioro del control de retroalimentación negativa. Así mismo, en ratas, la exposición prenatal al estrés genera una reducción en la expresión de los receptores a GC (Barbazanges *et al.*, 1996) o de ambos recursos en el hipocampo de la descendencia (Henry *et al.*, 1994), dependiendo de la naturaleza y el momento de la exposición al estrés prenatal y el sexo de la descendencia. Aunado a lo anterior, incluso, la exposición a estresores sociales, por ejemplo, derrota social a la rata intrusa en su última semana de embarazo por una rata lactante residente durante 5 días, produce también la reducción significativa de la expresión de MR (NR3C2, por sus siglas en inglés: nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2) en el hipocampo de la descendencia, mientras que la expresión de los GR (NR3C1, por sus siglas en inglés: nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1) no es afectada en gran parte, tanto en el hipocampo como en el PVH (Brunton y Russell, 2010). Por lo tanto, la reducción en la expresión de MR en el hipocampo puede contribuir al deterioro del control de

retroalimentación del eje HPA, sin embargo, esto debe ser probado funcionalmente (Brunton y Russell, 2010). Aunque el mecanismo por el cual los corticosteroides reducen la expresión de los MR en el hipocampo no son claros aún, los GR y MR pueden ser detectados en el hipocampo fetal desde los días 13 y 16 gestacionales, respectivamente (Díaz *et al.*, 1998). Por lo tanto, es concebible que los niveles elevados de GC de la madre podrían interactuar con los promotores NR3C1 y / o NR3C2 del feto, alterando su expresión génica.

Todo lo anteriormente mencionado podría estar relacionado con alteraciones en la citoarquitectura neural, sobre todo del hipocampo, como uno de los mecanismos centrales de la desregulación en la retroalimentación negativa del eje HPA. Tanto los GC, como los aminoácidos excitatorios están involucrados en la hipertrofia neuronal inducida por la exposición al estrés, la cual ha sido reportada para roedores, primates (Gould *et al.*, 1997), y ahora, en este trabajo, por primera vez en tortuga marina. No obstante, el rol de los GC sobre la remodelación estructural del cerebro involucra la interacción de múltiples mediadores, tales como, el neurotransmisor glutamato y su receptor N-metil-D aspartato (NMDA), y el ion calcio (McEwen, 2010; Boyle, 2013).

Mediante el análisis seleccionado para evaluar la citoarquitectura neuronal (análisis de Sholl) en las crías emergentes de *L. olivacea*, fueron reveladas remodelaciones importantes de los árboles dendríticos de la población de neuronas piramidales en la DMC (región homóloga a la subregión CA3 del hipocampo de mamíferos (Ulinsky, 1990; Reiner, 1993), región relevante en la regulación del eje HPA), disminución de la densidad dendrítica a lo largo de los estratos del DMC, siendo más pronunciada conforme más se acerca al soma, así como áreas neuronales significativamente reducidas en las crías que emergieron de los NHH. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado en la literatura para mamíferos (Vyas *et al.*, 2002; Champagne *et al.* 2008; Hajszan *et al.*, 2008; Alfarez *et al.*, 2009; Morales-Medina *et al.*, 2009), en donde se reporta la atrofia de las dendritas de las células piramidales de CA1 del hipocampo de ratas (de mediana edad) expuestas al estrés en la vida temprana, con reducciones en la longitud y la arborización dendrítica (Brunson *et al.*, 2005). De modo semejante, ha sido reportado en dos especies de aves (*Parus atricapillus* y *P.*

carolinensis) que el cautiverio produce la disminución significativa de los somas de las neuronas hipocampales (Pravosudov *et al.*, 2015).

En los mamíferos, daños en el hipocampo afectan la memoria episódica, declarativa y el aprendizaje espacial (Sutherland *et al.*, 1982), además del control de las funciones autonómicas, tales como la secreción de adrenocorticotropina (ACTH, Jacobson y Sapolsky, 1991). En aves, se afectan la navegación espacial (Morris *et al.*, 1982) y la búsqueda de alimento (Sherry *et al.*, 1989; Pravosudov *et al.*, 2015). En el caso de la lagartija *Cnemidophorus inornatus*, lesiones en subregiones de la corteza, tales como la MC y DC tienen efectos en la memoria espacial (Day *et al.*, 2001). Estudios futuros en las tortugas marinas deberán explorar el impacto de las modificaciones cerebrales aquí encontradas. La capacidad para identificar los cambios en las morfologías de las neuronas es esencial en la comprensión de la función del sistema nervioso y la disfunción. La morfología neuronal desempeña un papel importante en la determinación de cómo las neuronas funcionan y se comunican. Específicamente, cambios en su morfología afectan su capacidad para recibir aportaciones de otras células, la propagación del potencial de acción, y el cómo se procesa la información (Fiala *et al.*, 2002).

En mamíferos, una prolongada y/o excesiva exposición a los glucocorticoides afectan el desarrollo gonadal a diferentes niveles (Paul *et al.*, 2008; Pedrana *et al.*, 2008). En ovejas, la restricción alimenticia o una dosis farmacológica (0.05 mg/kg) de betametasona en hembras preñadas durante el día 104 de gestación (dG) genera diversas afectaciones en los fetos macho de 110 dG, tal como, la reducción de: el peso testicular, de la longitud de los cordones seminíferos, de la cantidad de tejido intersticial (en el que están incluidas las células de Leydig), el tamaño de las células de sertoli y de los gonocitos (Pedrana *et al.*, 2008). Dichos efectos tienen el potencial de afectar la capacidad reproductiva en la edad adulta, dado que el desarrollo de las células testiculares está altamente correlacionado con la productividad y la calidad del esperma (Martin *et al.*, 2010). De manera semejante, en hembras de rata de 5 días de nacidas, el tratamiento farmacológico con dexametasona produce significativamente la reducción en el peso de los

ovarios, el número de células germinativas saludables y el número de folículos primordiales. Por el contrario, genera un aumento en el número de folículos primordiales atrésicos (Ristić *et al.*, 2008; Manojlović-Stojanoski *et al.*, 2012). Dichos autores discuten los múltiples mediadores a nivel celular que podrían ser la causa de los efectos que la exposición a glucocorticoides en el útero de mamíferos genera. Entre éstos se menciona la alteración en los niveles de expresión de receptores, enzimas, canales iónicos y transportadores, en una amplia gama de tipos celulares, durante la gestación tardía. También cambia la expresión de diversos factores de crecimiento, proteínas citoarquitecturales, proteínas de unión, y componentes de las vías de señalización intracelular. Estos cambios influirán en el funcionamiento basal de la célula y sus respuestas a los estímulos endocrinos y metabólicos, con consecuencias para su tamaño, tasa de proliferación y la diferenciación terminal. Además de estos efectos directos, los glucocorticoides pueden actuar indirectamente sobre la proliferación de tejidos y la diferenciación mediante cambios en la secreción celular de proteínas, hormonas, factores de crecimiento y metabólicos (Ulrich-Lai *et al.*, 2006; Pedrana *et al.*, 2008; Pyykkonen *et al.*, 2010).

Adicionalmente, en los mamíferos, organismos sometidos de manera crónica al estrés durante la etapa prenatal, pueden desarrollar un comportamiento alterado (por ejemplo, agresividad, depresión, Kapoor y Matthews 2008, Leigh, 2010), disfunción reproductiva (por como la infertilidad, Kapoor y Matthwes, 2008), síndrome metabólico (Pyykkonen *et al.*, 2010), depresión inmune (Martin, 2009) e incluso enfermedades degenerativas, que afectan a varios sistemas de órganos (p. ej., sistema cardiovascular) en algún momento de sus vidas (Engler, y Engler, 1995). La exposición crónica al estrés en etapa prenatal también programa e imprime el genoma del gameto (Chehreie *et al.*, 2013), transmitiendo así, estados enfermos a la progeie a través de la herencia epigenética transgeneracional (Jablonka y Raz, 2009; Leigh, 2010; Daxinger y Whitelaw, 2012; Heard y Martienssen, 2014).

En este trabajo las crías NHH mostraron hipotrofia testicular y un número reducido de células epiteliales en los cordones seminíferos. Por lo tanto, es posible que los criaderos de todo el mundo

estén liberando numerosos especímenes que pueden llevar rasgos heredables no adaptativos, aunque, en este trabajo no proporcionamos evidencia concreta que avale dicha posibilidad. De acuerdo con nuestros resultados, es probable que las prácticas de conservación actuales puedan tener un impacto negativo en el éxito reproductivo a largo plazo. Por lo tanto, esta acción solo debe emprenderse cuando no haya otra alternativa disponible. Implementando progresivamente, otras prácticas conservacionistas, tales como, la protección de las nidadas *in situ*, el control de depredadores, así como, el cuidado de las playas de desove.

Finalmente, las presentes observaciones también son significativas con respecto a la actividad de retener las crías poco después de la emergencia durante varias horas, debido a que también promueve una exposición al estrés post-emergencia.

XIII. CONCLUSIÓN GENERAL

El punto más sobresaliente de esta investigación es la evidencia anatómica y fisiológica de la sobre-activación de las respuestas al estrés post-emergencia asociadas a la incubación en nidos hechos por el hombre y post-emergencia asociadas a la retención de los neonatos. Dichas respuestas pueden llegar a tener consecuencias a largo plazo.

XIV. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Nuestros hallazgos sugieren la activación de las respuestas al estrés en los distintos eventos evaluados y se discutieron las consecuencias que ello puede generar, por lo que es recomendable, continuar aclarando, mediante su estudio varias cuestiones que enlistaremos a continuación:

- i. Llevar a cabo la cuantificación de la influencia del hecho de trasladar los huevos, proponiendo diferentes materiales y métodos de traslado.

- ii. Evidenciar anatómica y fisiológicamente respuestas crónicas al estrés en estadios fetales, evitando la influencia del período de frenesí.
- iii. Monitorear parámetros ambientales y correlacionarlos con los efectos asociados.
- iv. Monitorear las respuestas al estrés en un mediano plazo, de modo que se permita evaluar la permanencia de los efectos asociados a la incubación en nidos hechos por el hombre, tal y como se ha reportado en mamíferos.
- v. Determinar el impacto de la recolección de los huevos hacia los viveros sobre los niveles y el ciclo de nutrientes, así como sobre la cadena trófica, es decir, como impacta la remoción de los huevos sobre la tasa poblacional de cangrejos, aves y mamíferos, etc.
- vi. De igual relevancia tiene indagar en los mecanismos genéticos y epigenéticos que subyacen a las respuestas crónicas al estrés.
- vii. Desde un punto de vista evolutivo, sería relevante determinar si las áreas corticales cerebrales tienen la función de reprimir las respuestas al estrés.
- viii. Así mismo, desarrollar estudios etológicos sobre conductas asociadas a respuestas al estrés para estos organismos.

XV. RECOMENDACIONES GENERALES

Evitar en lo posible estas prácticas innecesarias y desarrollar nuevas tecnologías para la conservación de crías de tortuga marina, que no condicionen la fisiología de las mismas. Una propuesta simplificada sería evaluar distintos tipos de jaulas que eviten la depredación de nidadas *in situ*.

XVI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Aboitiz, F. y Zamorano, F. (2013). Neural progenitors, patterning and ecology in neocortical origins. *Frontiers of neuroanatomy*. 7 (38), 1-15. Doi: 10.3389/fnana.2013.00038.
- Abreu-Grobois, A. y Plotkin, P. (2008). *Lepidochelys olivacea*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014. 3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on December 18th, 2014.
- Adam, V., Tur, C., Rees, A. F., y Tomas, J. (2007). Emergence pattern of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) hatchlings from Kyparissia Bay, Greece. *Marine Biology*. 151 (5), 1743–1749.
- Aguirre-Samudio, A. J., De la Fuente-Juárez, G., Márquez-Orozco, A. y Márquez-Orozco, M. C. (2010). Ovary correlation between function-morphology of effect of the stress and flunitrazepam administered during gestation in adult mouse. *International Journal of Morphology*. 28 (1), 309-316.
- Ajika, K., Kalra, S. P., Fawcett, C. P., Krulich, L., y McCann, S. M. (1972). The effect of stress and nembutal on plasma levels of gonadotropins and prolactin in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 90, 707-715.
- Alfarez, D. N., De Simoni, A., Velzing, E. H., Bracey, E., Joëls, M., Edwards, F. A., y Krugers, H. J. (2009). Corticosterone reduces dendritic complexity in developing hippocampal CA1 neurons. *Hippocampus*. 19 (9), 828-36. Doi:10.1002/hipo.20566.
- Alvarado, D. J., y Delgado, T. C. (2004). Tortugas marinas de Michoacán, historia natural y conservación. 1^{era} Edición. Comisión de Pesca en el Estado de Michoacán, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Eds). Morelia, Mchoacán, México. 140 Pp.
- Ariens, K. C. U., Huber, G. C., y Crosby, E. C. (1936). The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man. Hafner, New York.
- Ariens, K. C. U. (1929). The evolution of the nervous system in invertebrates, vertebrates and man. E F Bonh, Haarlem.
- Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E., y Evans, R. M. (1998). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 4812 (237), 268-275.

- Arzola-González, J. F. (2007). Humedad y temperatura en nidos naturales y artificiales de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschsholtz 1829). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 42 (3), 377 – 383.
- Aubret, F., Blanvillain, G. y Kok, P. J. R. (2015). Myth busting? Effects of embryo positioning and egg turning on hatching success in the water snake *Natrix maura*. *Scientific Reports*. 5, 13385. Doi: 10.1038/srep13385 1.
- Barbazanges, A., Piazza, P. V., Le Moal, M., y Maccari, S. (1996). Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *Journal of Neuroscience* 16, 3943–3949.
- Bardin, C. W., Chen, C. L. C., Morris, P. T., Gerendai, I., Boitani, C., Lions, A. S., Margioris, A., Krieger, D. T. (1987). Proopiomelanocortin derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction. In: Clark, J. H. (Ed). *Recent Progress in Hormone Research*. Orlando, FL: Academic Press: pp. 24.
- Bennur, S., Rao, B. S. S., Pawlack, R., Strickland, S., McEwen, B. S., y Chattarji, S. (2007). Stress-induced spine loss in the medial amygdale is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience*. 144, 8-16.
- Bézy, S. V., Roldán, A. V. y Craig, J. P. (2014). Olive ridley sea turtle hatching success as a function of microbial abundance and the microenvironment of in situ nest sand at Ostional, Costa Rica. *Journal of Marine Biology*. 10 (2), e0118579.
- Bhatnagar, S, Lee T, & Vining C. 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. Doi:10.1016/j.yhbeh.2004.11.019.
- Blake, C. A. (1975). Effects of stress on pulsatile luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 148, 813-815.
- Blanton, M. G., Shen, J. M., y Kriegstein A. R. (1987). Evidence for the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid in aspiny and sparsely spiny nonpyramidal neurons of the turtle dorsal cortex. *Journal of Comparative Neurology*. 8, 259 (2), 277-97.
- Bonier, F., Martin, P. R., Moore, I. T. y Wingfield, J. C. (2009). Do baseline glucocorticoids predict fitness?. *Trends in Ecology and Evolution*. 24 (11), 634-642.

- Booth, D. T. y Astill, K. (2001). Temperature variation within and between nests of the green sea turtle, *Chelonia mydas* (Chelonia: Cheloniidae) on Heron Island, Great Barrier Reef, Austrian Journal Zoology. 49, 71–84.
- Boyle, L. M. (2005). The anatomy and physiology of the human stress response. En Everly, G.S. and Lating J. M. (Eds). A clinical guide to the treatment of the human stress response. pp 17-51. Springer Science Business Media. Har over. New York. ISBN: 978-1-4614-5537-0. Doi 10.1007/978-1-4614-5538-7_2.
- Boyle, L. M. (2013). A neuroplasticity hypothesis of chronic stress in the basolateral amygdala. The Yale Journal of Biology and Medicine. 86 (2), 1-17.
- Briski, K. P., Sylvester, W. (1988). Effect of specific acute stressors on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-treated female rats. Neuroendocrinology. 47, 194-202.
- Brunson, K. L., Kramár, E., Lin, B., Chen, Y., Colgin, L. L., Yanagihara, T. K., Lynch, G. y Baram, T. Z. (2005). Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. Journal of Neuroscience. 12 (41), 9328-9338.
- Brunton, J. P. (2013). Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. Reproduction. 146, 175–189.
- Brunton, J. P., y Russell, J. A. (2010). Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex specific effects. Journal of Neuroendocrinology. 22, 258–271.
- Burgess, A. E., Booth, D. T. y Lanyon, J. M. (2006). Swimming performance of hatchling green turtle is affected by incubation temperature. Coral Reefs. 25 (3), 341–349. Doi 10.1007/s00338-006-0116-7.
- Bustard, R. (1972). Sea turtles, natural history and conservation. Collins, London. 220 Pp.
- Cameron, N., Del Corpo, A., Diorio, J., McAllister, K., Sharma, S., y Meaney, M. J. (2008). Maternal programming of sexual behavior and hypothalamic-pituitary-gonadal function in the female rat. Plos one. 3 (5), e2210.

- Champagne, D. L., y Bagot, R. C. (2008). Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *Journal of Neuroscience*. 28 (23), 6037-6045.
- Chan, E. H., Salleh, H. D. y Liew, H. C. (1985). Effects of handling on hatchability of eggs of the leatherback turtle, *Dermochelys coriacea* (L.). *Pertanika*. 8 (2), 265- 271.
- Chehreie, S., Rabzia, A., and Farhadi-Mesterkhani, M. (2013). Maternal water deprivation affects the spermatogenesis of the offspring rats. *International Journal of Morphology*. 31, 156–161. Doi: 10.4067/S0717-95022013000100026.
- Chrousos, G. P. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. In: Csermely, P. (Ed). *Stress of life: from molecules to man*. *Annals of the New York Academic Science*. 851, 311 – 35.
- Chrousos, G. P. (1992). Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: The corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 21, 833-858.
- Chrousos, G. P., y Gold, P. W. (1992). The concept of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. *JAMA, Journal American Medical Association*. 267, 1244-52.
- Clusella-Trullas, S., Paladino, F. V. (2007). Micro-environment of olive ridley turtle nests deposited during an aggregated nesting event. *Journal of Zoology*. 272, 367–376.
- Connor, B. W. y Kriegstein, A. R. (1986). Cellular physiology of the turtle visual cortex: Distinctive properties of pyramidal and stellate neurons. *The Journal of Neuroscience*. 6 (1), 164-177.
- Crews, D. (1974). Effects of group stability, male-male aggression and male court ship behavior on environmentally induced ovarian recrudescence in the lizard *Anolis carolinensis*. *Journal of Zoology London*. 172, 419-441.
- Daxinger, L., y Whitelaw, E. (2012). Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Review Genetic*. 13 (3), 153-62. Doi: 10.1038/nrg3188.
- Day, L. B., Crew, D., y Wilczynski, W. (2001). Effects of medial and dorsal cortex lesions on spatial memory in lizards. *Behavioral Brain Research*. 118, 27–42.

- De La Rosa-Prieto, C., Flores-Cuadrado, A., Saiz, D., y Liberia, T. (2015). Olfactory and cortical projections to bulbar and hippocampal adult-born neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*. 9 (4). Doi: 10.3389/fnana.2015.00004.
- DeGregorio, B. A., y Southwood, W. A. (2011). Incubation temperatures and metabolic heating of relocated and in situ loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) nests at a Northern Rookery. *Chelonian Conservation and Biology*. 10 (1), 54-61.
- DeNardo, D. F., y Sinervo, B. (1994). Effects of steroid hormone interaction on activity and home-range size of male lizard. *Hormones and Behavior*. 28, 273-287.
- DeNardo, D. F., y Licht, P. (1993). Effects of corticosterone on social behavior of male lizard. *Hormones and Behavior*. 27, 184-199.
- DePascuale, C., Neuberger, T., Hirrlinger, A. M. y Braithwaite, V. A. (2016). The influence of complex and threatening environments in early life on brain size and behavior. *Proceedings of the Royal Society B*. 283, 2015264.
- Desan, P. H. (1984). The organization of the cerebral cortex of the pond turtle, *Pseudemys scripta elegans*. Ph.D. dissertation, Harvard University, Cambridge, M. A.
- Díaz, R., Brown, R. W., y Sheckl, J. R. (1998). Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *Journal of Neuroscience*. 18, 2570-2580.
- Donaldson, E. M. (1981). The Pituitary-interrenal axis as an indicator of Stress in fish. En: *Stress and fish*. AD Pickering (Ed). Academic Press, London, pp. 11-47.
- Dugas-Ford, J., Rowell, J. J., y Ragsdale, C. W. (2012). Cell-type homologies and the origins of the neocortex. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*. 109, 16974-16979. Doi:10.1073/pnas.1204773109.
- Dunbar, S. G., Duran, N. N., Hayes, C., y Salinas, L. A., (2015). Activities of the protective turtle ecology center for training, Outreach, and Research, Inc. (ProTECTOR) in Honduras. *Science and Mathematics Faculty Publications*. 328. http://digitalcommons.cedarville.edu/science_and_mathematics_publications/328.

- Dunbar, G. S., Randazzo, A., Salinas, L., y Luque, J. (2013). Final report of the community-directed capacity building for hawksbill conservation and population recovery in Caribbean Honduras. United States Fish and Wildlife Service Grant Agreement. No. 96200-1-G116.
- Dutton, D. L., P. H. Dutton, M. Chaloupka, and R. H. Bouton. 2005. Increase of a Caribbean leatherback turtle *Dermochelys coriacea* nesting population linked to long-term nest protection. *Biological Conservation*. 126 (2), 186-194.
- Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A., y Donnelly, M. (1999). Research and management techniques for the conservation of sea turtles (IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.). Washington, D.C. (1725 De Sales Street, NW #600, Washington 20036): IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group.
- Eckert, K. L., y Eckert, S. A. (1990). Embryo mortality and hatch success in *In situ* and translocated leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea* eggs. *Biological Conservation*. 53 (1), 37–46.
- Elliot, S. G. (1910). Some problems relating to the evolution of the brain. *Lancet*. 1, 147-153.
- Engler, M. B., y Engler, M. M. (1995). Assessment of the cardiovascular effects of stress. *Journal of Cardiovascular Nursing*. 10, 51–63. Doi: 10.1097/00005082-199510000-00005.
- Eschscholtz, F. (1829). Zoologischer Atlas, enthaltend Abbildungen und Beschreibungen neuer Thierarten, während des Flottcapitains von Kotzebue zweiter Reise um die Welt, auf der Russisch-Kaiserlichen Kriegsschlupp Predpriaetië in den Jahren.. Heft 1. G. Reimer, Berlin. pp. 1823–1826.
- Euker, J. S., Meites, J., Riegler, G. D. (1975). Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology*. 96, 85-92.
- Ewert, M. A. (1979). The embryo and its egg: development and natural history, pp. 333-113. In: Harless, M. and Morlock, H. (Eds), *Turtles: Perspectives and Research*, John Wiley and Sons, N.Y., xvi plus 695 Pp.
- Fedulov, V., Rex, C. S., Simmons, D. A., Palmer, L., Gall, C. M. y Lych, G. (2007). Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *Journal Neuroscience*. 27, 8031–8039.
- Fiala, J. C., Spacek, J., y Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Research. Brain Research Reviews*. 39, 29–54.

- Fitzinger, L. (1843). Sys Rept. 1, 30.
- Frye, C. A. y Orecki, Z. A. (2002). Prenatal stress alters reproductive responses of rats in behavioral estrus and paced mating of hormone-primed rats. *Hormones and Behavior*. 42, 472–483. Doi:10.1006/hbeh.2002.1834.
- Fuxe, K., Wikstrom, A. C., Okret, S., Agnati, L. F., Harfstrand, A., Yu, Z. Y., Granholm, L., Zoli, M., Vale, W., y Gustafsson, J. A. (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.
- Gaos, A. R., Liles, M. J., Gadea V., Peña de Niz, A., Vallejo, F., Miranda C., Darquea, J. J., Henriquez, A. Altamirano, E., Rivera, A., Chavarría S., Melero S, D., Urteaga, J., Pacheco, C. M., Chácon, D., LeMarie, C., Alfaro-Shigueto, J., Mangel, J. C., Yañez, I. L., y. Seminoff, J. A. (2017). Living on the Edge: Hawksbill turtle nesting and conservation along the Eastern Pacific Rim. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 45 (3), 572-584. Doi: 10.3856/vol45-issue3-fulltext-7.
- Gaos, A. R., Abreu, G. A., Alfaro, J. A., Amorocho, D., Arauz, R., Baquero, A., *et al.*, (2010). Signs of hope in the EP: international collaboration reveals encouraging status for a severely depleted population of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata*. *Oryx. The International Journal of Conservation*. 44, 595–601.
- Geneser, F. (2007). *Histología sobre bases biomoleculares*. 3ra ed. 7ª reimpression. Medica Panamericana S. A. Argentina. 813 pp.
- Glen, F., Broderick, A. C., Godley, B. J., Hays, G. C. (2005). Patterns in the emergence of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) turtle hatchlings from their nests. *Marine Biology*. 146, 1039–1049.
- Godfrey, M. H., y Mrosovsky, N. (1997). Estimating the time between hatching of sea turtles and their emergence from the nest. *Cheloniidae Conservation Biology*. 2, 581–584.
- Goffinet, A. M, Daumerie, C., Langerwerf, B., Pieau, C. (1983). Neurogenesis in reptilian cortical structure: 3H-thymidine autoradiographic analysis. *Journal of Comparative Neurology*. 243, 106-116.

- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentat gyrus of adult primates can be suppressed by stress. *Society for Neuroscience*. 17 (7), 2492-2498.
- Greenberg, N. (2002). Ethological aspects of stress in model lizard, *Anolis carolinensis*. *Integrative and Comparative Biology*. 42, 526–540.
- Greenberg, N. y Wingfield, J. C. (1987). Stress and reproduction: reciprocal relationships. In Norris, D. O. y Jones, R. E. (eds.), *Reproductive endocrinology of fishes, amphibians and reptiles*. Wiley, New York. pp. 389–426.
- Gregory, L. F. y Schmid, J. R. (2001). Stress Responses and sexing of wild kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*) in the Northeastern Gulf of Mexico. *General and Comparative Endocrinology*. 124, 66-74.
- Hajszan, T., Dow, A., Warner-Schmidt, J. L., Szigeti-Buck, K., Sallam, N. L., Parducz, A., Leranth, C., Duman, R. S. (2008). Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biological Psychiatry*. 65, 392–400.
- Hart, E. Catherine, Zavala-Norzagaray, A. A., Benítez-Luna, O., Plata-Rosas, L. J., Abreu-Grobois, F. A. y Ley-Quinonez, C. P. (2016). Effects of incubation technique on proxies for olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) neonate fitness. *Amphibia-Reptilia*. ©Koninklijke Brill NV, Leiden. Doi: 10.1163/15685381-00003072.
- Heard, E. y Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms. *Cell*. 157, 95-109. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>.
- Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Le Moal, M. y Maccari, S. (1994). Prenatal stress increases the hypothalamo pituitary–adrenal axis response in young and adult rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 6, 341–345. Doi:10.1111/j.1365-2826.1994.tb00591.x.
- Herman, P. J., Ostrander, M. M., Muller, N. K., y Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanism of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 29, 1201-1213.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C. y Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling

- hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 24, 151–180.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., Morano, M. I., Akil, H., y Watson, S. J. (1995). Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Journal of Neuroendocrinology*. 7, 475–482.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., Young, E. A., Akil, H., y Watson, S. J. (1992). Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus CRH and AVP mRNA expression. *Brain Research*. 592, 228–238.
- Herman, J. P., Schafer, M. K-H., Young, E. A., Thompson, R., Douglass, J., Akil, H., y Watson, S. J. (1989). Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Journal of Neuroscience*. 9, 3072–3082.
- Hewavisenthi, S., y Parmenter, C. J. (2002). Egg components and utilization of yolk lipid during development of the flatback turtle *Natatur depressus*. *Journal of Herpetology*. 36 (1), 43 - 50.
- Hewavisenthi, S. (2001). Turtle hatcheries in Sri Lanka: Boon or Bane?. *Marine turtle newsletter* 60, 19-22. <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn60/mtn60p19.shtml>
- Hill, R. L. (1971). Surinam turtle notes -1. Polymorphism of costal and vertebral laminae in the sea turtle *Lepidochelys olivacea* Stichting Natuurbehoud Suriname (STINASU). *Mededelingen*. 2, 1-9.
- Holson, R. R., Gough, B., Sullivan, P., Badger, T. y Sheehan, D. M. (1995). Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 17, 393–401. Doi: 10.1016/0892-0362(94)00074-N.
- Ischer, T., Ireland, K., and Booth, D. T. (2009). Locomotion performance of green turtle hatchlings from the Heron Island Rookery, Great Barrier Reef. *Marine Biology*. 156, 1399 –1409. Doi: 10.1007/s00227-009-1180-7123.
- Jablonka, E. y Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quartely Review of Biology*. 84 (2), 131-76. Doi: 10.1086/598822.
- Jacobson, L. y Sapolsky, R. M. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*. 12, 118– 134.

- Jacobson, L., Akana, S.F., Cascio, C.S., Shinsako, J., y Dallman, M.F., (1988). Circadian variation in plasma corticosterone permit normal termination of adrenocorticotropin responses to stress. *Endocrinology*. 122, 1343– 1348.
- Jenkins, S. A., y Porter, T. E. (2004). Ontogeny of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis in the chicken embryo: a review. *Domestic Animals Endocrinology*. 26, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.01.001>.
- Jessop, T. S. y Hamann, M. (2005). Interplay between age class, sex and stress response in green turtles (*Chelonia mydas*). *Australian Journal of Zoology*. 53 (2), 131. Doi: 10.1071/ZO04061.
- Johnston, J. B. (1913). The morphology of the septum, hippocampus, and pallial commissures in reptiles and mammals. *Journal of Comparative Neurology*. 23, 371-478.
- Jones, M. S. y Bell, K. (2004). Plasma corticosterone concentrations in males of the skink *Egernia whitii* during acute and chronic confinement, and over a diel period. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 137, 105–113.
- Kapoor, A. y Matthews, S. G. (2008). Prenatal Stress Modifies Behavior and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function in Female Guinea Pig Offspring: Effects of Timing of Prenatal Stress and Stage of Reproductive Cycle. *Endocrinology*. 149 (12), 6406–6415. Doi:10.1210/en.2008-0347.
- Kawashima-Ohya, Y., Narita, Y., Nagashima, H., Usuda, R., and Kuratani, S. (2011). Hepatocyte growth factor is crucial for development of the carapace in turtles. *Evolution and Development*. 13, 260–268. Doi: 10.1111/j.1525-142X.2011.00474.x.
- Kılıç, Ç. y Candan, O. (2014). Hatchling sex ratio, body weight and nest parameters for *Chelonia mydas* nesting on Sugözü beaches (Turkey). *Animal Biodiversity and Conservation*. 37 (2), 177–182.
- Knapp, R. y Moore, C. M. (1997). Mole morphis in tree lizards have different testosterone responses to elevated levels of corticosterone. *General and Compaarative Endocrinology*. 107 (2), 273-9. Doi10.1006/gcen.1997.6923.
- Kuntz, A. (1912). The development of the adrenal in the turtle. *Hertwig's Handbu*. 3 (2) Part 1, 443 - 616.

- Kyrou, I., y Tsigos, C. (2005). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. En *Adrenal glands: Diagnostic aspects and surgical therapy*. Linos, Dimitrios A., van Heerden, Jon A. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 19-28. Doi: 10.1007/3-540-26861-8_3.
- Lance, V. A. (1984). Endocrinology of reproduction in males reptiles. *Symposia of the Zoological Society of London*. 52, 357-383.
- Leigh, H. (2010). How does stress work? The role of memes in epigenesis. En: *Genes, memes, culture, and mental illness, toward an integrative model*, H. Leigh (Ed). San Francisco, CA: Springer Press, pp.11–22.
- Licht, P. (1967). Environmental control of annual testicular cycles in the lizard *Anolis carolinensis*. I. Interaction of light and temperature in the initiation of testicular recrudescence. *Journal of Experimental Zoology*. 165, 505-516.
- Limpus, C. J., Baker, V. y Miller, J. D. (1979). Movement induced mortality of loggerhead eggs. *Herpetologica*. 35, 335-8.
- Magariños, A. M., Orchinik, M., McEwen, B. S. (1998). Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox. *Brain Research*. 809, 314–318.
- Margariños, A. M., McEwen, B. S., Flugge, G. y Funch, E. (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *The Journal of Neuroscience*. 16 (10), 3534-3540.
- Maguire, J. (2014). Stress-induced plasticity of GABAergic inhibitions. *Frontiers in Cell Neuroscience*. 8, 157. Doi: 10.3389/fncel.2014.00157.
- Manojlovic-Stojanoski, N. N. y Milosevic, V. (2012). Prenatal glucocorticoids short-term benefits and long-term risks. In *New recognition of our familiar friend*, Xiaoxiao Qian (Ed.), InTech. 14, 337-390. Doi: 10.5772/51106. Available from: <https://www.intechopen.com/books/glucocorticoids-new-recognition-of-our-familiar-friend/prenatal-glucocorticoids-short-term-benefits-and-long-term-risks> Intech.

- Manzo, C., Zerani, M., Gobbetti, A., Di Fiore, M. M. y Angelini, F. (1994). Is corticosterone involved in the reproductive processes of the male lizard *Podarcis siculata siculata*? *Hormone Behaviour*. 28, 117- 129.
- Marcovaldi, M. A. y Laurent, A. (1996). A six season study of marine turtle nesting at Praia do Forte, Bahia, Brazil, with implications for conservation and management. *Chelonian Conservation and Biology*. 2 (1), 55-59.
- Martin, G. B., Blache, D., Miller, D. W., y Vercoe, P. E. (2010). Interactions between nutrition and reproduction in management of the mature male ruminant. *Animal*. 4 (7), 1214–1226. Doi: 10.1017/S1751731109991674.
- Martin, B. L. (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. *General and Comparative Endocrinology*. 163, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.008>.
- Mast, R. B. y Carr, J. L. (1989). Carapacial scute variation in Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempt*) hatchlings and juveniles. In *Proceedings of the First International Symposium on Kemp's Ridley Sea Turtle Biology, Conservation and Management* (Caillouet, C. W. Jr. and Landry, A. M. Jr., eds.), TAMU-SG-89-105, pp. 202-219.
- Matteri, R. L., Carroll, J. A. y Dyer, C. J. (2000). Neuroendocrine responses to stress. *Metabolism*. 51 (6 Suppl 1), 5-10.
- McCoy, C. J., Vogt, R. C. y Censky, E. J. (1983). Temperature controlled sex determination in the sea turtle, *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetological*. 17, 404-406.
- McEwen, B. S. (2010). Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Annals of the New York Academic of Science*. 1204 (Suppl. E), 38-59. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05568.x.
- McEwen, B. S. y Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*. 43, 2-15.
- Meaney, M. J., Szyf, M. y Seckl, J. R. (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic–pituitary–adrenal function and health. *Trends in Molecular Medicine*. 13, 269–277. Doi:10.1016/j.molmed. 2007.05.003.

- Medina, L., Abellán, A., y Desfilis, E. (2017). Contribution of genoarchitecture to understanding hippocampal evolution and development. *Brain Behavior and Evolution*. 90, 25-40. <https://doi.org/10.1159/000477558>.
- Medina, L., y Reiner, A. (2000) Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? *Trends in Neuroscience*. 23, 1–12.
- Métin, C., Goffinet, J.-P., Rakiaie, S., Parnavelas, J. G. (2006). Cell and molecular mechanism involved in the migrations of cortical interneurons. *Journal of Comparative Neurology*. 23, 894-900.
- Milano, E. G. (1991). Development of the adrenal gland in amniotes: A comparison between chelonians and birds. *Bolletino di Zoologia*. 58, 205-209. Doi: 10.1080/11250009109355753.
- Moore, I. T., Greene, M., J. Lerner, D. T., Asher, C. E., Kronmer, R. W., Hess, D. L, Whintter, J., y Manzon, R. T. (2005). Physiological evidence for reproductive suppression in the introduced population of brown tree snakes (*Boiga irregularis*) on Guam. *Biological Conservation*. 121 (1), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.04.012>.
- Moore, I. T. y Jessop, T. S. (2003). Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior* 43, 39–47. Doi: 10.1016/S0018-506X(02)00038-7.
- Moore, I. T., Greene, M. J., Mason, R. T. (2001). Environmental and seasonal adaptation of the adrenocortical and gonadal responses to capture stress in two population of the male garter snake, *Thamnophis sirtalis*. *The Journal of Experimental Zoology*. 289 (2), 99–108.
- Moore, I. T., Lemaster, M. P. y Mason, R. T. (2000). Behavioral and hormonal response to capture stress in the male red-side garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. *Animal Behaviour*. 59, 529-534. <https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1344>.
- Morales-Medina, J. C., Sanchez, F., Flores, G., Dumont, Y. y Quirion, R. (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.
- Morreale, S. J., Ruiz, G. J., Spotila, J. R. y Standora, E. A. (1982). Temperature-dependent sex determination: current practices threaten. *Conservation of sea turtles*. *Science*. 216 (4551), 1245-1247. PMID: 7079758.

- Morris, R., Garrud, P., Rawlins, J., y O'Keefe, J. O. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297, 681-3. 10.1038/297681a0.
- Mrosovsky, N. (2008). Against over simplifying the issues on relocating turtle eggs. *Environmental management*. 41, 465–467.
- Mrosovsky, N. (1994). Sex ratios of sea turtles. *Journal of Experimental Zoology*. 270, 16–27.
- Mrosousky, N. e Yntema, C. (1980). Temperature dependence of sexual differentiation in sex turtles: Implications for conservation practices. *Biology Conservation*. 18, 271-280.
- Mulder E J, H P, G, Robles de Medina A, C Huizink, B, R H Van den Berg, J K Buitelaar, G H, A Visser. (2002). Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Human Development*. 70 (1-2), 3-14.
- Naumann, R. K., Ondracek, J. M., Reiter, S., Shein-Idelson, M., Tosches, M. A., Yamawaki, T. M., y Laurent, G. (2015). The reptilian brain. *Current Biology*. 25 (8), R317–R321. Doi: 10.1016/j.cub.2015.02.049.
- Neill, J. D. (1970). Effect of stress on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*. 87, 1192-1197.
- Norris, O. D., y López, K. (2010). *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Vol. 5. Mammals. Ed. Elsevier. ISBN: 978-0-12-374928-4. 400 Pp.
- Northcutt, R. G. (1981). Evolution of the telencephalon in nonmammals. *Annual Review of Neuroscience*. 4, 301-350.
- Özdemîr, B. A., y Türkozan, O. (2006). Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in Northern Cyprus. *Turkish Journal of Zoology*. 30 (2), 141-146.
- Parmenter, C. J. (1980). Incubation of the eggs of the green sea turtle, *Chelonia mydas*, in Torres Strait, Australia: the effect of movement on hatchability. *Australia Wildlife Research*. 7, 487-91.
- Patino-Martínez, J., Marco, A., Quiñones, L., Abella, E., Abad R. M., and Diéguez-Uribeondo, J. (2011). How do hatcheries influence embryonic development of sea turtle eggs? Experimental analysis and isolation of microorganisms in Latherback turtle eggs. *Journal of Experimental Zoology*. 317, 47–54.

- Paul, C., Rhind, S. M., Kyle, C. E., Scott, H., McKinnell, C., Sharpe, R. M. (2008). Cellular and hormonal disruption of fetal testis development in sheep reared on pasture treated with sewage sludge. *Environmental Health Perspectives*. 113 (11), 1580-1587. <http://www.jstor.org/stable/3436575>.
- Pearson, A. K., Wurst, G. Z., Cadle J. E. (1983). Ontogeny and immunocytochemical differentiation of the pituitary gland in a sea turtle, *Caretta caretta*. *Anatomy and Embryology*. 167, 13-37.
- Pedrana, G., Sloboda, D. M., Pérez, W., Newnham, J. P., Bielli, A., y Martin, G. B. (2008). Effects of pre-natal glucocorticoids on testicular development in sheep. *Anatomía Histología y Embriología*. 5, 352-8.
- Phillot, A. D. y Parmenter, C. J. (2012). Anti-fungal properties of sea turtle cloacal mucus and egg albumen. *Marine Turtle Newsletter*. 134, 17-21.
- Phillott, A. D., y Parmenter, C. J. (2011). Fungal colonization of green sea turtle (*Chelonia mydas*) nests is unlikely to affect hatchling condition. *Herpetological Conservation and Biology*. 9 (2), 297–301.
- Phillott, A. D., y Parmenter, C. J. (2006). The ultrastructure of sea turtle eggshell does not contribute to interspecies variation in fungal invasion of the egg. *Canadian Journal of Zoology*. 84, 1339–1344.
- Pilcher, N. J., y Enderby, J. S. (2001). Effects of prolonged retention in hatcheries on green turtle (*Chelonia mydas*) hatchling swimming speed and survival. *Journal of Herpetology*. 35, 633-638.
- Pintus, K. J., Godley B. J., McGowan, A., y Broderick, A. C. (2009). Impact of clutch relocation on green turtle offspring. *The journal of wildlife management*. 73 (17), 1151– 1157.
- Pottinger, T. G. y Carrick, T. R. (2000). Indicators of reproductive performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) selected for high and low responsiveness to stress. *Aquaculture Research*. 31, 367-375.
- Pravosudov, V. V., Roth, T. C., LaDage, L. D., Freas, C. A. (2015). Environmental influences on spatial memory and the hippocampus in food-caching chickadees. *Comparative Cognition and Behavior Reviews*. 10, 25-42.
- Pyykkonen, " A-J., Raikkonen, " K., Tuomi, T., Eriksson, J. G., Groop, L., Isomaa, B. (2010). Stressful life events and the metabolic syndrome. *Diabetes care*. 33 (2), 378–384. Doi: 10.2337/dc09-1027.
- Radley, J. J. y Sawchenko, P. E. (2011). A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. *Journal of Neuroscience*. 31 (21), 9683-9695.

- Rakic, P. A. (1995). Small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends in Neuroscience*. 18, 383-8.
- Reece, S. E., Broderick, A. C, Godley, B., y West, S. A. (2002). The effects of incubation environment, sex and pedigree on the hatchling phenotype in a natural population of loggerhead turtles. *Evolutionary Ecology Research*. 4, 737–748.
- Rees, A. F., Tzovani, E. y Margaritoulis, D. (2002). Conservation activities for the protection of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in Kyparissia Bay, during 2001. *Testudo*. 5, 45-54.
- Reiner, A., y Northcutt, R. G. (2000). Succinic dehydrogenase histochemistry reveals the location of the putative primary visual and auditory areas within the dorsal ventricular ridge of *Sphenodon punctatus*. *Brain Behavior and Evolution*. 55, 26–36.
- Reiner A. (1993). Neurotransmitter organization and connections of turtle cortex: implications for the evolution of mammalian isocortex. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 104A, 735–748.
- Reiner, A. (1991). A comparison of the neurotransmitter-specific and neuropeptide-specific neuronal cell types present in turtle cortex to those present in mammalian isocortex: Implications for the evolution of isocortex. *Brain Behaviour and Evolution*. 38, 53–91.
- Reiner, A., Brauth, S.E., y Karten, H. J. (1984). Evolution of the amniote basal ganglia. *Trends Neuroscience*. 7, 320–325.
- Reiner, A., y Powers, A. S. (1983). The effects of lesions of telencephalic visual structures on the visual discrimination performance of turtles (*Chrysemys picta picta*). *Journal of Comparative Neurology*. 218, 1–24.
- 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.
- Ristić, N., Nestorović, N., Manojlović, M., Filipović, B., Šošić-Jurvević, B., Milošević, V. y Sekulić, M. (2008). Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. *Journal of Microscopy*. 232, 549–557.
- Rivier, C. y Rivest, S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biology of Reproduction*. 45, 523-532.

- Romero, L. M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Tree*. 19 (5), 249-255.
- Sarti, M. L., Barragán, R. A., García, M. D., García, N., Huerta, P., and Vargas, F. (2007). Conservation and biology of the Leatherback turtle in the Mexican Pacific. *Chelonian Conservation Biology*. 6 (1), 70–78.
- Schreck, C. B., W. Contreras-Sánchez, y Fitzpatrick, M. S. (2001). Effects of stress on fish reproduction gamete quality, and progeny. *Aquaculture*. 197, 3-24.
- Seminoff, J. A., y Shanker, K. (2008). Marine turtles and IUCN Red Listing: A review of the process, the pitfalls, and novel assessment approaches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 356, 52 – 68.
- Shanker, K., Pandav, B., y Choudhury, B. C. (2004). An assessment of olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) nesting population in Orissa on the east coast of India. *Biological Conservation*. 115, 149-160.
- Shanker, K., Choudhury, B. C., Andrews, H. V. (2003). Sea turtle conservation: Beach management and hatchery programmes. Centre for Herpetology/Madras Crocodile Bank Trust, Tamil Nadu, India.
- Shen, J. M. y Kriegstein, A. R. (1986). The hippocampal cortex contains distinct cell types, burst-firing neurons, and an epileptogenic subfield. *Journal of Neurophysiology*. 56 (6), 1626-1649.
- Sherry, D. F., Vaccarino, A. L., Buckenham, K. y Herz, R. S. (1989). The hippocampal complex of food-storing birds. *Brain Behavior and Evolution*. 34, 308–317. Doi: 10.1159/000116516.
- Shinoda, Y., y Sugihara, I. (2013) Axonal Trajectories of Single Climbing and Mossy Fiber Neurons in the Cerebellar Cortex and Nucleus. En: Manto, M., Schmammann, J. D., Rossi, F., Gruol D. L., Koibuchi, N., (eds). *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1333-8_20.
- Shors, T. J. (2001). Acute stress rapidly and persistently enhances memory formation in the male rat. *Neurobiology of Learning and Memory*. 75, 10–29.
- Siow, K. T. y Moll, E. O. (1982). Status and conservation of estuarine and sea turtles in West Malaysian waters. En Bjorndal, K. A., (ed.), (1981). *Biology and Conservation of sea turtles*. Proceeding of

- the World Conference of Sea Turtle Conservation. Smithsonian Institution Press. Washington, D. C. 583 Pp.
- Siow, K. T. (1981). Leathery turtle (*Dermochelys coriacea*) conservation programme in Rantau Abang, Terengganu, Malaysia. En Ong K. S., and Jothy A. A., (Eds). Proceeding of the First Marine Society Conference of Malaysia. 90 Pp.
- Sönmez, B., Turan, C., Özdilek, S. Y. (2011). The effect of relocation on the morphology of Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), hatchlings on Samandag beach, Turkey (Reptilia: Cheloniidae). *Zoology in the Middle East*. 52, 29–38. ISSN 0939-7140.
- Stratakis, C. A. y Chrousos, G. P. (1995). Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Annals of the New York Academy of Science*. 771, 1-18.
- Sutherland, R. J., Kolb, B., Whishaw, I. Q. (1982). Spatial mapping: definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat. *Neuroscience Letters*. 31, 271–276.
- Sykora-Bodie, S. T., Bezy, V., Johnston, D. W., Newton, E., y Lohmann, K. J. (2017). Quantifying Nearshore SeaTurtle Densities: Applications of Unmanned Aerial Systems for Population Assessments. *Scientific Report*. 7, 17690. Doi: 10.1038/s41598-017-17719-x.
- Tiwari, M., Wallace, B. P. y Girondot, M. (2013). *Dermochelys coriacea* (Northwest Atlantic Ocean subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T46967827A46967830. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-2.RLTS.T46967827A46967830.en>.
- Tokarz, R. R. (1987). Effects of the antiandrogens cyproterone acetate and flutamide on male reproductive behavior in a lizard (*Anolis sagrei*). *Elservier*. 201, 11-16.
- Tsigos, C. y Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*. 53, 865-871.
- Tucker, T. y Hall, K. (1984). Leatherback tagging study: Isla de Culebra, Puerto Rico. *Marine Turtle Newsletter*. 31, 6-7.
- Tuorto, F., Alifragis, P., Failla, V., Parnavelas, J. G., Gulisano, M. (2003). Tangential migration of cells from the basal to the dorsal telencephalic regions in the chick. *European Journal of Neuroscience*. 18, 3388–3393.

- Turkozan, O., Ilgaz, C., Taşkavak, E., y Ozdemir, A. (2003). Hatch rates of loggerhead turtles and physical characteristics of the beach at Fethiye, Turkey. *Journal of Marine Biological Association of the UK*. 83, 231-232.
- Tuttle, J., y Rostal, D. (2010). Effects of nest relocation on nest temperature and embryonic development of Loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Chelonian Conservation Biology*. 9 (1), 1-7. <https://doi.org/10.2744/CCB-0769.1>.
- Ulinsky, P. S. (1990). The cerebral cortex of reptiles. En EG Jones & A Peters (Eds.). *Comparative Structure and Evolution of Cerebral Cortex, Part I Volume 8A Chapter 5 of the series Cerebral Cortex*. ISBN 978-1-4757-9624-7. Pp. 139-215.
- Ulrich-Lai, Y. M. y Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Review Neuroscience*. 10, 397-409.
- Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Engeland, W. C., y Herman, J. P. (2006). Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 291, 965–973.
- Vale, W., Speiss, J., Rivier, C., Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science*. 213, 1394-1397.
- Van de Merwe, J., Ibrahim, K., y Whittier, J. (2013). Post-emergence handling of green turtle hatchlings: Improving hatchery management worldwide. *Animal Conservation*. 16, 316–323.
- Van de Merwe, J., Ibrahim, K., y Whittier, J. (2005). Effects of hatchery shading and nest depth on the development and quality of *Chelonia mydas* hatchlings: Implications for hatchery. *Australian Journal of Zoology*. 53, 205–211.
- Van de Merwe, J., Ibrahim, K., Irvebrant, M. y Whittier, J. M. (2002). Effects of hatchery nest density on the emergence success and quality of *Chelonia mydas* hatchlings. In *Proceedings of the 3rd workshop on SEASTAR2000: 115–119*. Arai, N., (Ed.). Bangkok: Southeast Asia Sea Turtle Associative Research.
- Venkatesan, E S., Kannan, P., Rajagopalan, M. y Vivekanandan, E. (2005). Embryonic energetics in the egg of the green turtle *Chelonia mydas*. *Journal of Marine Biology. Ass. India*. 47 (2), 193-197.

- Viau, V. (2002). Functional Cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and adrenal axes. *Journal of Neuroendocrinology*. 14, 506-513.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana, R. B. S., Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *Journal of Neuroscience*. 22 (15), 6810-8.
- Wallace, B. P., Tiwari, M., y Girondot. M. (2013). *Dermochelys coriacea* (East Pacific Ocean subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T46967807A46967809. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-2.RLTS.T46967807A46967809.en>.
- Wallace, B. P., DiMatteo, A. D., Bolten, A. B., Chaloupka, M. Y., Hutchinson, B. J., Abreu-Grobois, F. A., Mortimer, J. A., Seminoff, J.A., Amoroch, D., Bjorndal, K. A., Bourjea, J., Bowen, B. W., BriseñoDueñas, R., Casale, P., Choudhury, B. C., Costa, A., Dutton, P. H., Fallabrino, A., Finkbeiner, E. M., Girard, A., Girondot, M., Hamann, M., Hurley, B. J., LópezMendilaharsu, M., Marcovaldi, M.A., Musick, J.A., Nel, R., Pilcher, N. J., Troëng, S., Witherington, W., y Mast. R. (2011). Global conservation priorities for marine turtles. *PLoS ONE*. 6 (9), e24510.
- Wallace, B. P., Sotherland, P. R., Tomillo, P. S., Bouchard, S. S., Reina, R. D., Spotila, J. R., Paladino, F. V. (2006). Egg components, egg size, and hatchling size in leatherback turtle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Molecular and Integrative Physiology*. 145, 524–532. Doi:10.1016/j.cbpa.2006.08.040.
- Wang, C. T., Shui, H. A., Huang, R. L., Tai, M. Y., Peng, M. T. y Tsai, Y. F. (2006). Sexual motivation is demasculinized, but not feminized, in prenatally stressed male rats. *Neuroscience*. 138, 357–364. Doi:10.1016/j.neuroscience.2005.11.026.
- Whitmore, C. P. y Dutton, P. H. (1985). Infertility, embryonic mortality and nest-site selection in leatherback and green sea turtles in Suriname. *Biological Conservation*. 34 (3), 251-272.
- Wyneken, J., y Salmon, M. (1992). Frenzy and post frenzy swimming activity in Loggerhead, Green, and Leatherback hatchling sea turtles. *Copeia*. 1992 (2), 478-484. Doi: 10.2307/1446208.
- Yajurvedi, H. N. y Menon, S. (2005). Influence of stress on gonadotrophin induced testicular recrudescence in the lizard *Mabuya Carinat*. *Journal of Experimental Zoology*. 303(A), 534-540.

- Yajurvedi, H. N. y Nijagal, B. S. (2000). Corticosterone inhibits hormonal and FSH-induced testicular redudence in the lizard, *Mabuya Carinata*. *General and Comparative Endocrinology*. 120, 283-288.
- Yntema, C. L. y Mrosovsky, N. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtle. *Canadian Journal of Zoology*. 60, 1012-1016.
- Yu, X. D., Di Giorgio, P. F., Yao, J., Marchetto, C. M., Brennand, K., Wright, R., Mei, A., Mchenry, L., Lisuk, D., Grasmick, J. M., Silberman, P., Silberman, G., Jappelli, R., y Gage, H. F. (2014). Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2, 295–310.