



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO

EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN: RECURSOS BIÓTICOS

Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales

**Efectos de la incubación en viveros sobre la neurogénesis en la tortuga
golfina (*Lepidochelys olivacea*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

M. C. NANCY MARISOL UNDA DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Héctor H. Nava Bravo

CO-DIRECTORA DE TESIS: Dra. Alma Lilia Fuentes Farías



Morelia, Michoacán, Diciembre 2022

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi querido esposo y compañero de vida Antonio Gómez por su apoyo incondicional, por creer en mí, porque aunque hemos pasado momentos difíciles él siempre ha estado para apoyarme, por darme ánimos día a día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales

A mis dos amores; mis hijos Sarah e Israel porque me han enseñado que en los momentos más difíciles hay que salir adelante, Ustedes son mi principal motivación para superarme cada día

A mis queridos padres Jacqueline y Enrique, a mi hermana Liss por todo su amor incondicional, enseñanzas, por sus consejos, dedicación. Su apoyo ha sido indispensable para poder terminar mis estudios y permitir cumplir un sueño más ... Los amo!!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por haberme aceptado en su Programa Institucional de Doctorado, por los recursos e instalaciones para poder realizar este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca para mis estudios de posgrado y por el financiamiento del proyecto CONACyT no. 258747AF-F otorgado a la Dra. Alma Lilia Fuentes Farías del cual fue posible realizar la presente tesis.

Al Programa Institucional en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por las facilidades otorgadas.

A la Dra. Alma, Dra. Esperanza y Dr. Héctor por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional, por su tiempo, dirección académica, orientación y aportaciones en la presente investigación, así como en la redacción del artículo científico.

A los miembros del Comité tutorial Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, Dra. Luz Torner por sus aportaciones en el desarrollo del proyecto, por acompañarme desde el inicio de esta nueva etapa, por sus evaluaciones y por su tiempo.

Al Dr. Bryan Phillips, Dr. Leonel López, Dr. Chiharu Murata, Dra. Naima Lajud por sus aportaciones para la realización del proyecto y del artículo.

A Lili Cerritos por su amabilidad, cariño, disponibilidad para todos los trámites administrativos del posgrado.

A mis amigos que siempre estuvieron conmigo apoyándome, Edel Pineda, Arturo Díaz, Johny, Guadalupe Delgado, Angela Castro, Claudia Arreola, Antonia Herrera, Fany Bucio.

A todo el laboratorio de Investigación en Eco-fisiología Animal

ÍNDICE

I. RESUMEN GENERAL	1
II. SUMMARY	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
IV. HIPÓTESIS	17
V. OBJETIVOS	17
General	17
Particulares	17
VI. CAPÍTULO I	
Negative effects on neurogenesis, ovariogenesis and fitness in sea turtle hatchlings associated to <i>ex – situ</i> conservation management	19
VII. DISCUSIÓN GENERAL	36
REFERENCIAS	43
ANEXO	
Estrés, neurogénesis y tortugas marinas	60

I. RESUMEN GENERAL

La tortuga marina *Lepidochelys* (L.) *olivacea*, conocida como tortuga golfina, tiene como principales sitios de anidación en México, los estados de Michoacán y Oaxaca (Benabib y Cruz, 1981). En la última lista roja de la UICN “Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza”; en las listas de los Apéndices I y II de la Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestres “CMS, por sus siglas en inglés, referida también como Convención de Bonn”, en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, CITES y en la NOM-59-SEMARNAT-2010 está categorizada como especie en peligro de extinción para México. Ante dicha situación, se han creado programas de conservación con la finalidad de recuperar sus poblaciones (Eckert *et al.*, 2000; Márquez, 2000; Romero, 2004), estos dependen en gran medida del éxito de la incubación de los huevos. Una de las estrategias que se han implementado es la creación de viveros, en los cuales los huevos recién ovopositados son trasladados para ser resguardados hasta su eclosión. Este proceso, que implica la manipulación, la rotación o la vibración durante el traslado, puede afectar el desarrollo del organismo de manera negativa (Limpus *et al.*, 1979; Sönmez *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que factores relacionados con la incubación en nidos de vivero o artificiales pueden provocar estrés durante el desarrollo embrionario, debido a que la arquitectura del nido artificial dista mucho de la del nido natural, principalmente por el incremento de la compactación de la arena que provoca estrés mecánico, aumenta la temperatura y propicia una baja disponibilidad de oxígeno para los neonatos dentro de los nidos (Baldwin *et al.*, 1989; Chacón *et al.*, 2007). Estudios en mamíferos, han demostrado que la exposición crónica al estrés prenatal afecta el éxito del nacimiento, así como la anatomía y el ensamble de los circuitos neuronales en diversas regiones cerebrales (Morales-Medina *et al.*, 2009) con lo cual hay un déficit en la expresión de ciertas conductas y alta predisposición a patologías (Stewart *et al.*, 2005). En el caso de las tortugas marinas, se demostró que las crías de *L. olivacea* eclosionadas de nidos artificiales presentan alteraciones en la citoarquitectura del

hipotálamo, la corteza dorso medial (Cdm) y la amígdala, así como un incremento en los niveles de corticosterona (Herrera-Vargas *et al.*, 2017).

La exposición a estrés prenatal no solo perturba las capacidades sexuales y/o reproductivas (Sapolsky *et al.*, 1996, Denardo y Licht, 1993; Greenberg, 2002; Kapoor y Matthews, 2008), sino también promueve efectos neurobiológicos negativos (Weinstock, 1997), como la disminución de la neurogénesis (Lemaire *et al.*, 2000).

Dado lo anterior, surge nuestra hipótesis, que plantea que el estrés crónico en *L. olivacea* causado por la incubación artificial inducirá una disminución en el número de células nuevas en la corteza dorso medial (Cdm) y medial (Cm), así como a una disminución de células progenitoras en la zona ventricular (ZV), que son las principales áreas neurogénicas en estos organismos. En caso de comprobar el efecto negativo en el proceso de neurogénesis en embriones de *L. olivacea*, debido a la reubicación de los nidos, este estudio aportaría elementos de gran peso para hacer un llamado al replanteamiento de las medidas de conservación no solo de la especie *L. olivacea*, sino de todas las especies de tortugas marinas del mundo.

Palabras claves: *Lepidochelys olivacea*, neurogénesis, viveros.

II. SUMMARY

The sea turtle *Lepidochelys (L.) olivacea*, known as olive ridley turtle, has as its main nesting sites in Mexico, the states of Michoacán and Oaxaca (Benabib and Cruz, 1981). In the latest red list of the IUCN (International Union for Conservation of Nature), in the lists of Appendices I and II of the Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals (CMS, also referred to as the Bonn Convention), in Appendix I of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), and in NOM-59-SEMARNAT-2010, it is categorized as an endangered species in Mexico. In view of this situation, conservation programs have been created in order to recover their populations (Eckert *et al.*, 2000; Márquez, 2000; Romero, 2004), which depend to a great extent on the success of egg incubation. One of the strategies that have been implemented is the creation of hatcheries, where the recently ovoposited eggs are transferred to be kept until hatching. This process, which involves handling, rotation or vibration during transfer, can negatively affect the development of the organism (Limpus *et al.*, 1979; Sönmez *et al.*, 2011).

On the other hand, it has been shown that factors related to incubation in hatchery or artificial nests can cause stress during embryonic development, because the architecture of the artificial nest is far from that of the natural nest, mainly due to the increased compaction of the sand that causes mechanical stress, increases the temperature and favors a low availability of oxygen for the hatchlings inside the nests (Baldwin *et al.*, 1989; Chacón *et al.*, 2007). Studies in mammals have shown that chronic exposure to prenatal stress affects birth success, as well as the anatomy and assembly of neuronal circuits in various brain regions (Morales-Medina *et al.*, 2009), resulting in a deficit in the expression of certain behaviors and a high predisposition to pathologies (Stewart *et al.*, 2005). In the case of sea turtles, it was shown that hatchlings of *L. olivacea* hatched from artificial nests present alterations in the cytoarchitecture of the hypothalamus, dorsomedial cortex (DMC) and amygdala, as well as an increase in corticosterone levels (Herrera-Vargas *et al.*, 2017).

Prenatal stress exposure not only disrupts sexual and/or reproductive abilities (Sapolsky *et al.*, 1996, Denardo and Lighr, 1993; Greenberg, 2002; Kapoor and

Matthews, 2008), but also promotes negative neurobiological effects (Weinstock, 1997), such as decreased neurogenesis (Lemaire *et al.*, 2000).

Given the above, we hypothesize that chronic stress in *L. olivacea* caused by artificial incubation will induce a decrease in the number of new cells in the dorsomedial (Cdm) and medial (Cm) cortex, as well as a decrease of progenitor cells in the ventricular zone (VZ), which are the main neurogenic areas in these organisms. If the negative effect on the process of neurogenesis in *L. olivacea* embryos due to the relocation of nests is proven, this study would provide important elements to call for a rethinking of conservation measures not only for the species *L. olivacea*, but for all sea turtle species in the world.

Keywords: *Lepidochelys olivacea*, neurogenesis, nurseries

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las tortugas marinas son especies longevas que se distribuyen en una gran área, ocupando varios hábitats durante toda su vida, muchas especies migran grandes distancias para su reproducción y alimentación (Wallace *et al.*, 2010). Las nidadas permanecen en incubación de 45 a 60 días dependiendo la especie. Durante ese periodo, las tortugas marinas tienen una gran variedad de amenazas, por lo que se deben identificar las playas de anidación para promover su conservación y optimizar su efectividad.

Hasta el siglo XIX, las tortugas marinas fueron muy abundantes, con una distribución en océanos templados y tropicales. En la actualidad sus poblaciones se encuentran muy reducidas ya que enfrentan diversas problemáticas como la pesca excesiva o incidental, el comercio ilícito, el saqueo de sus huevos, la captura y el consumo de las hembras anidadoras, la degradación de hábitat (UICN/CSE, 1995).

Las tortugas marinas son importantes biológicamente porque forman parte de las cadenas alimenticias, tanto en las playas como en los hábitats costeros. Incluso existen estudios que demuestran que sus huevos o cascarones ayudan al mantenimiento de las raíces de algunas gramíneas y en la estabilidad de las dunas costeras (Bjorndal y Jackson, 2002). Conocer sobre el ciclo de vida de estos organismos es necesario para determinar programas de conservación.

La vida de las tortugas marinas comienza con la puesta de los huevos dentro de los nidos que las madres construyen en la arena (Abreu *et al.*, 2016; Fig. 1). La incubación ocurre sin ningún cuidado parental y el éxito de la eclosión depende en gran medida de factores externos como la temperatura, la humedad, las marejadas, etc. En este sentido, la humedad y la temperatura son dos de los parámetros ambientales más importantes para que la incubación sea viable. La temperatura debe tener un rango de entre 24-25°C y 34- 35°C (Ackerman, 1997), el sexo de las tortugas marinas es definido por la temperatura durante la incubación, a este lapso de tiempo se le llama “periodo termosensible” (PTS). Si los huevos de una tortuga se incuban por debajo de 27.7 ° C, las tortugas recién nacidas serán machos; sin embargo, si los se huevos incuban por encima de 31° C, las crías serán femeninas. Por otro lado, la temperatura

del PTS a la cual se obtiene una proporción del 50% de los sexos se le conoce como “temperatura pivote” y generalmente es de 29°C; si la temperatura es mayor durante el PTS la proporción de hembras será mayor y la proporción de machos será mayor cuando está por debajo (Mrosovsky, 1994).

Al concluir el periodo embrionario, las crías rompen el cascarón (eclosionan), usualmente emergen simultáneamente de la arena por la tarde o en las primeras horas de la noche, lo cual es una estrategia que les permite evadir a los depredadores diurnos y evitar altas temperaturas ambientales que les provocarían insolación, deshidratación e incluso la muerte; una vez emergidas se dirigen hacia el mar (Mrosovsky y Kingsmill, 1985) (Fig. 1), orientadas por diferentes señales como el brillo de la luna, el sonido de las olas y la pendiente de la playa, entre otros (Van Rhijn y Gorkom, 1983).

Existe la hipótesis de que, durante el transcurso de la emergencia del nido y la llegada al mar, las crías imprimen en su memoria (impronta) un conjunto de observaciones que les permiten construir un mapa magnético innato con el que reconocerán el sitio de nacimiento, y regresarán a la misma playa una vez alcanzada la edad reproductiva (Brothers y Lohmann, 2015). Al terminar la temporada de cópula, las hembras continúan con el proceso reproductivo, mientras que los machos regresan a sus sitios de alimentación o permanecen a las cercanías (Jeffrey, 1997; Fig 1).

La construcción del nido depende de la especie (Fig. 1). La profundidad del nido (35-70cm), por ejemplo, depende de las dimensiones de las aletas traseras. El tamaño del grano de la arena es otra variable que la tortuga marina tiene en cuenta en el momento de la selección del sitio para anidar. Márquez-García (2010), demostró que la tortuga Carey prefiere arenas medias (0.25mm) para la anidación, mientras que la tortuga caguama prefiere arenas muy gruesas (1mm) (Foley *et al.*, 2006).

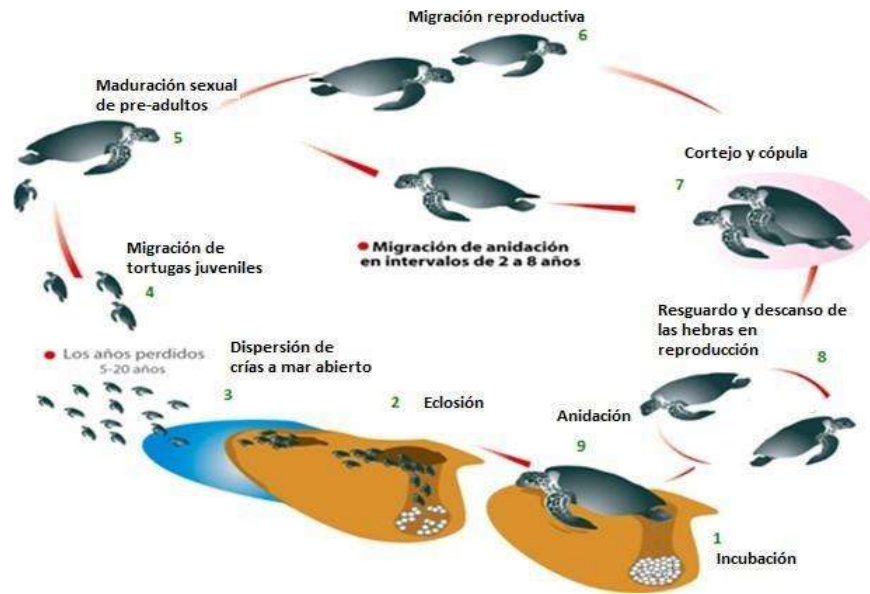


Fig. 1 Esquema representativo de las nueve fases del ciclo de vida de la tortuga marina. (1) huevos (incubación), (2) crías (eclosión), (3) dispersión de crías en mar abierto, (4) migración de tortugas juveniles, (5) maduración sexual de pre-adultos, (6) migración reproductiva, (7) cortejo y cópula, (8) resguardo y descanso entre periodos de desove por las hembras durante la temporada de anidación, (9) anidación y retorno de las hembras (modificado de la Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas ([www. lacseaturtle.org](http://www.lacseaturtle.org))).

Uno de los retos más importantes a los que se enfrentan las tortugas marinas es el calentamiento global. Este afecta las temperaturas de la arena, elevándolas por encima de los valores de viabilidad y provocando la muerte de los embriones (Saba *et al.*, 2012). Los efectos del calentamiento global sobre las tortugas marinas podrían: reducir el desempeño locomotor de las crías e incluso llevarlas a la muerte (Booth y Evans, 2011), así como, favorecer la producción de hembras, afectando la capacidad de reproducirse por la feminización completa de la población (Poloczanska *et al.*, 2009).

La tortuga golfina es la especie más pequeña de la familia Cheloniidae. Presenta un caparazón de forma casi circular, con una longitud de 67.6 cm hasta 78 cm aproximadamente y su ancho representa el 90% de su largo (Márquez *et al.*, 1976) (Fig. 2).

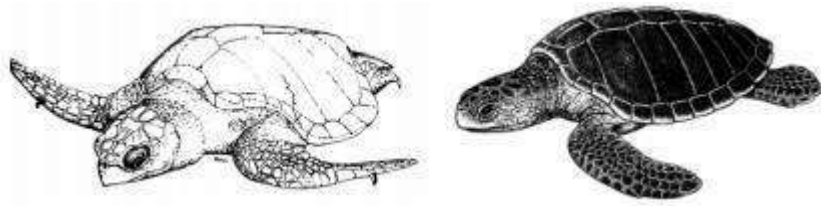


Fig. 2 Esquema de la tortuga golfina *L. olivacea*, Eschscholtz, 1829 (Tomado de Márquez, 1996)

La Conservación sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna (CITES) enlista a *L. olivacea* en su Apéndice I como especie en peligro de extinción. Una de las medidas de conservación que ha sido probada en *L. olivacea* es la protección de los nidos, que consiste en remover los nidos naturales (NN) a sitios seguros para su protección. Para Eckert y colaboradores (2000), la finalidad de los planes de conservación para la tortuga marina como la instauración de los viveros o nidos artificiales (NH), es promover la sobrevivencia de las poblaciones y la seguridad de los hábitats a largo plazo.

Sin embargo, se ha reportado que el traslado y el manejo de huevos de NN a los NH puede ocasionar un menor éxito de eclosión y una alteración del sexo de las crías (Pritchard, 1995). De acuerdo con Miller (1985) una vez que la tortuga coloca los huevos sobre la arena en pocas horas (de 4 a 8 hrs, dependiendo la temperatura del nido) se reanuda el desarrollo de los embriones. El traslado (movimiento) de los huevos a los viveros puede provocar un rompimiento de la membrana vitelina dando como resultado la muerte del embrión.

Bustard y Greenham (1968) demostraron que la humedad es otro factor para mantener la temperatura de los nidos, y que es importante que se mantengan valores óptimos para el equilibrio osmótico de los huevos para un buen desarrollo embrionario. Con base en estos estudios es importante tener cuidado con los efectos que podrían tener las técnicas de conservación para la especie, como es la reubicación de huevos de NN a NH, ya que podría existir un cambio en la temperatura del nido (Mortimer, 1990).

Recordemos que una vez que las tortugas alcanzan su madurez sexual se reproducen cerca de los sitios de nacimiento (FitzSimmons *et al.*, 1997). Existen diversos experimentos que han indicado que los animales son capaces de hacer mapas internos o mentales para su navegación (Tolman, 1948).

Un evento importante dentro del área de las neurociencias fue el descubrir que el hipocampo está relacionado con los mapas cognitivos (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Taube *et al.*, 1990; Hafting *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, el hipocampo, claramente más que actuar como un GPS interno, desempeña un papel vital en una variedad de funciones, incluyendo la formación de la memoria (Scoville y Milner, 1957).

En mamíferos el giro dentado (GD) se desarrolla en un 80% durante las primeras semanas postnatales con la migración de las células progenitoras neurales (CPN) (Altman y Bayer, 1990; Fig. 3). Al final del desarrollo embrionario, los neuroblastos migran desde la matriz secundaria hacia el primordio del giro dentado, alineándose para formar la capa glomerular (CGL) externa (Fig. 3A). Aproximadamente al día 20 postnatal las CPN se concentran en la zona subgranular (ZSG) donde continuarán generando neuronas nuevas durante toda la vida del individuo (Fig. 3C) (Altman y Bayer, 1990; Kempermann *et al.*, 2003), disminuyendo drásticamente la neurogénesis durante la vejez (Lubbers *et al.*, 1985).

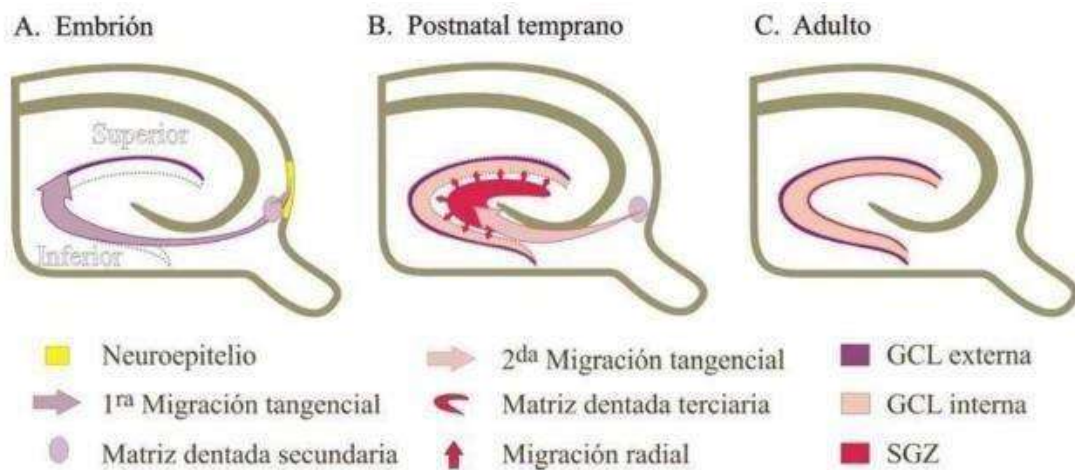


Fig. 3 Esquema del desarrollo del hipocampo, donde se representa el giro dentado. Las líneas punteadas representan la futura capa glomerular (CGL). La CGL externa es

la primera en formarse. (A) Diseño de un corte coronal de un embrión. (B) Diseño del cerebro de la etapa postnatal temprana de un mamífero y (C) Representación de un corte del hipocampo de un mamífero adulto (Modificado de Piatti *et al.*, 2006).

La evidencia anatómica y del desarrollo sugiere que la corteza más medial de los reptiles es homóloga al hipocampo de los mamíferos (Striedter, 2016; Medina *et al.*, 2017). Algunos estudios han demostrado que las cortezas mediales de la tortuga y del lagarto expresan la transcripción pan-hipocampal de mamíferos como el factor ZBTB20 (Fig. 6A). No se sabe con claridad si el GD del hipocampo, CA3, CA2 y CA1 están presentes en reptiles y aves. Sin embargo, se han descrito diferentes factores de transcripción en el GD y CA: en tortuga, PROX1 y MEF2C (específicos de las células granulares del DG de ratón) se han expresado en la corteza medial y ETV1, MEIS2, y LMO4 marcando la corteza dorsomedial (Fig. 4A). La expresión de estos genes en las cortezas mediales de tortugas y lagartos sugiere la existencia de GD y de tipos neuronales similares a CA en reptiles (Habib *et al.*, 2016). Por lo tanto, las células granulares del GD son conservadas en mamíferos y reptiles (Shen, 1986).

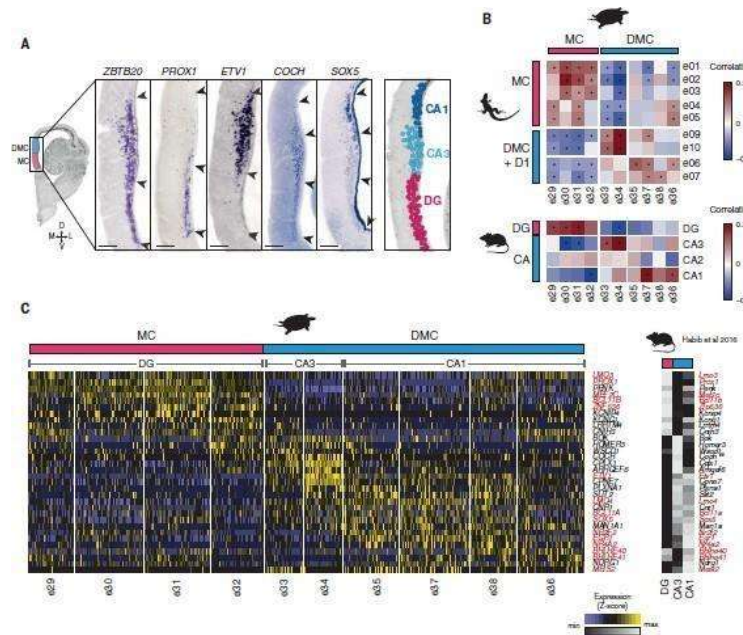


Fig. 4 Arquitectura molecular del hipocampo en un reptil. (A) Expresión de marcadores hipocampales en tortuga en la corteza medial (CM) y dorsomedial (CDM). Las puntas

de flecha indican los límites entre GD, CA3 y CA1 (comparado con el esquema de la derecha). D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral. (B) Correlaciones por pares de tortuga-lagarto (arriba) y tortuga y ratón (abajo). Los puntos indican una correlación estadística. En el lagarto, las cortezas mediales ZBTB20 + ETV1 + son denominados CDM y C1 en la literatura clásica, pero corresponden en las tortugas a CDM. (C) A la izquierda se indica la expresión de los marcadores del hipocampo de mamíferos en celdas individuales de tortuga (columnas, ordenadas por grupo) y a la derecha, la expresión de los mismos marcadores en ratón. Barras de escala, 200 mm. (Tomado de Tosches *et al.*, 2018)

Otra estructura que se conserva son los ventrículos, los cuales se forman a partir de uniones plegadas del ectodermo durante el desarrollo embrionario, la capa de células que rodea los ventrículos se denomina zona ventricular (ZV) (Fig. 5). La ZV consiste en una columna de epitelio pseudoestratificado de células proliferativas; las células que se originan en la ZV migran tanto radial como tangencialmente para llegar a su destino final (Nadarajah *et al.*, 2001; Fig. 5). Un número considerable de estudios ha demostrado que existe neurogénesis en vertebrados no mamíferos como el pez (Raymond y Easter, 1983), anfibios (Richter y Kranz, 1981), aves (Nottebohm, 1989) y reptiles (López-García *et al.*, 1988).

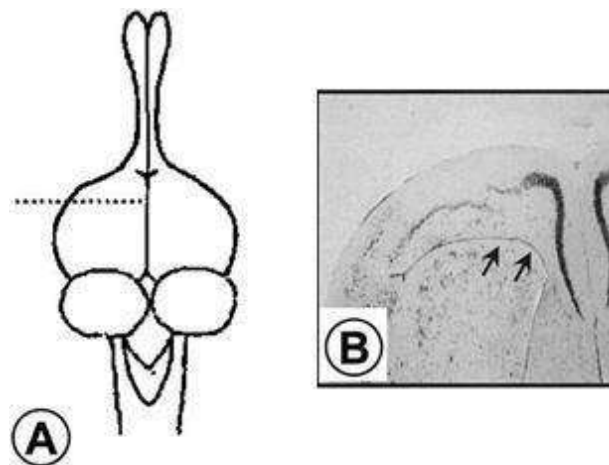


Fig. 5 Imagen del cerebro del reptil. (A) Esquema representativo del cerebro de un reptil. (B) Corte coronal del cerebro de un reptil, las flechas indican el ventrículo lateral donde la neurogénesis inicia (modificado de García-Verdugo *et al.*, 2002).

El cerebro es tan plástico que es capaz de presentar cambios, ya sean estructurales o funcionales a nivel del sistema nervioso, ocurriendo durante la maduración, el aprendizaje, cambios ambientales y patológicos como la epilepsia y la isquemia (Lledo *et al.*, 2006). En la década de 1960, Altman y colaboradores sugirieron que pueden nacer nuevas neuronas en el cerebro de los mamíferos adultos, tras estos estudios pioneros, los mecanismos de la neurogénesis adulta se han estudiado ampliamente durante décadas. Ahora se acepta que las nuevas neuronas se producen después del nacimiento en dos regiones del cerebro: la ZV y la zona subventricular (SVZ), ubicada en las paredes de los ventrículos laterales, y la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado de el hipocampo (Fig. 6). En estos dos nichos neurogénicos, se producen nuevas neuronas a partir de progenitores o células madre neurales (NSC) (Ming and Song, 2011; Cameron y Gass, 2015; Fig. 6).

El proceso de neurogénesis está regulado por el comportamiento, la experiencia y el estado emocional/biológico del individuo; este proceso se da en respuesta a señales fisiológicas y ambientales proporcionando plasticidad en los circuitos del hipocampo también llamada plasticidad hipocampal (Rosenzweig *et al.*, 1962; Tomohisa y Gage, 2018; Fig. 6). Se ha demostrado que un entorno enriquecido induce cambios estructurales y funcionales en el cerebro (Fiala *et al.*, 2002; Bartoletti *et al.*, 2004), la exposición a un ambiente enriquecido aumenta significativamente el número de células recién nacidas y el volumen de la capa de células granulares mejorando la velocidad de aprendizaje espacial (Kempermann *et al.*, 1997). Sin embargo, sigue sin estar claro cómo el enriquecimiento ambiental puede aumentar el número de células. Una posibilidad es, que las señales ambientales puedan cambiar la actividad de la red neuronal en el hipocampo que modula las entradas sinápticas en las neuronas inmaduras, así como la regulación epigenética. Por el contrario, el estrés y el envejecimiento disminuyen el número de neuronas adultas (Kuhn *et al.*, 1996; Gould *et al.*, 1997; Cameron y McKay, 1999)

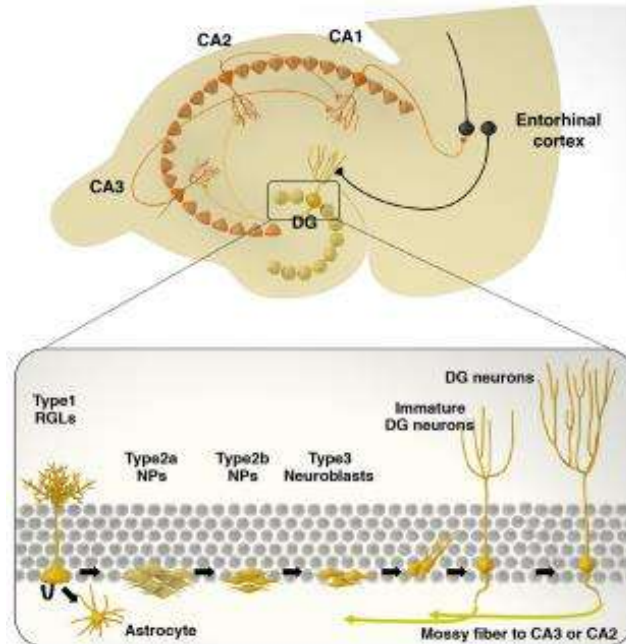


Fig. 6. Circuitos neuronales en el hipocampo. Células madre neurales adultas en el hipocampo (células radiales tipo glía tipo 1) y su diferenciación en la SGZ del GD con el factor de transcripción específico del tipo de célula. (Tomado de Tomohisa y Gage, 2017).

Se sabe que el estrés crónico o agudo puede ocasionar alteraciones en ciertos sistemas metabólicos, lo que produce una disminución en la neurogénesis y en la plasticidad neuronal (Abush y Akirav, 2013). El filósofo Walter Cannon fue quien por primera vez utilizó el término de estrés en 1914 (Cannon, 1914), describiéndolo como “una respuesta adaptativa del organismo ante una situación adversa”.

La respuesta fisiológica a estrés de los organismos es un proceso evolutivamente conservado, tiene la finalidad de generar una respuesta inmediata o anticipada frente a una situación de estrés lo cual implica la activación de dos sistemas fundamentales: 1) la activación inmediata del sistema nervioso autónomo simpático, que actúa incrementando los niveles plasmáticos de adrenalina y noradrenalina que permiten la movilización de energía, además de un aumento de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial y 2) la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA, por sus siglas en inglés), que es de respuesta más lenta y culmina con la liberación de

glucocorticoides (GC) (Myers *et al.*, 2012, 2014; McEwen *et al.*, 2015; McKlveen *et al.*, 2015; Schwabe *et al.*, 2012). El estrés activa una respuesta neuroendocrina a través del eje HPA con el fin de restablecer la homeostasis del organismo. Si esta activación del eje es pasajera, se considera como un fenómeno agudo (Selye, 1936). Sin embargo, cuando el estímulo es persistente y la actividad del eje HPA se mantiene en el tiempo, se considera como un estrés crónico (Graeff, 2011).

Como respuesta, el eje HPA reacciona ante esta situación, las neuronas neurosecretoras que se encuentran en el núcleo paraventricular del hipotálamo sintetizan el factor liberador de corticotropina (CRF) que actúa sobre el lóbulo anterior de la hipófisis también llamada adenohipófisis, para estimular la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Frandsen y Spurgeon, 1995). La ACTH se libera al torrente sanguíneo uniéndose a sus receptores en las células adrenocorticales para aumentar la biosíntesis de los corticoides (Denver, 2009; Fig.7).

La acción de los GC a corto plazo es beneficiosa para los organismos por sus efectos sobre la respuesta adaptativa al estrés, favoreciendo su supervivencia. Sin embargo, la exposición prolongada a estas hormonas puede causar diversas alteraciones conductuales y cognitivas, además de patologías relacionadas con el sistema inmunológico y patologías psiquiátricas como la esquizofrenia, la depresión o trastornos de ansiedad (Sapolsky *et al.*, 2000; McEwen, 2008; Pitman *et al.*, 2012). Es por ello que la secreción de GC está altamente regulada.

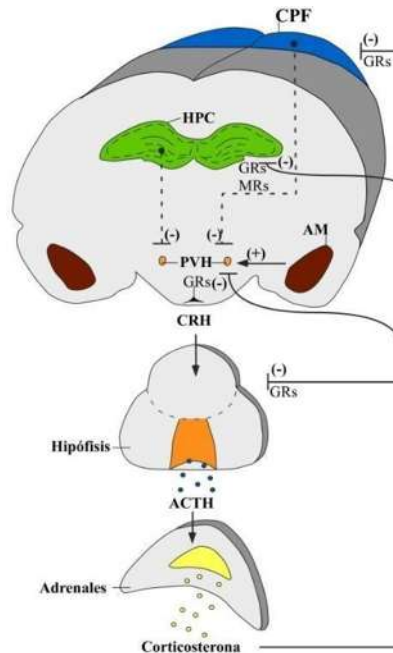


Fig. 7 Representación esquemática de la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en respuesta a un estresor. Durante una situación de estrés, la amígdala activa al hipotálamo (PVH) que libera CRH y en la hipófisis estimula la síntesis y la liberación de ACTH al torrente circulatorio, llegando a las glándulas adrenales e induciendo la síntesis y la liberación de corticosterona. (Tomado de Pryce, 2008).

En los reptiles, la principal hormona GC es la corticosterona. Los primeros estudios se realizaron en 1970 en el continente australiano. Bradshaw y Fortaine Bertrand (1970) hicieron por primera vez mediciones de corticosterona en plasma en lagartos de lengua azul (*Tiliqua rugosa*). Estudios posteriores en *Amphibolurus inermis* y *A. ornatus* demostraron que en épocas de sequía aumentaron las concentraciones endógenas de ACTH y junto con ello se observó una disminución en el peso corporal (Bradshaw, 1975).

Estudios en mamíferos han indicado que existe una correlación entre el estrés y la tasa neurogénica. Se ha demostrado que la exposición a diferentes estímulos estresantes, como el olor de un depredador, un choque eléctrico, la representación jerárquica en un grupo social, entre otros, disminuye la supervivencia de las nuevas células en el hipocampo de organismos adultos (Dagyte *et al.*, 2009).

Lemaire y colaboradores (2000) demostraron que las ratas estresadas prenatalmente tuvieron una disminución en la proliferación de células del hipocampo, así mismo mostraron un retraso en el aprendizaje de una tarea de memoria espacial. En experimentos con crías de conejillos de indias expuestas a estrés materno crónico, se registró un sistema HPA disfuncional en su adultez (Emack y Matthews, 2011), por lo cual, se asume que el estrés prenatal induce anomalías estructurales en la formación del hipocampo, lo que sugiere que el estrés en etapas tempranas acelera un declive en relación a la plasticidad hipocampal.

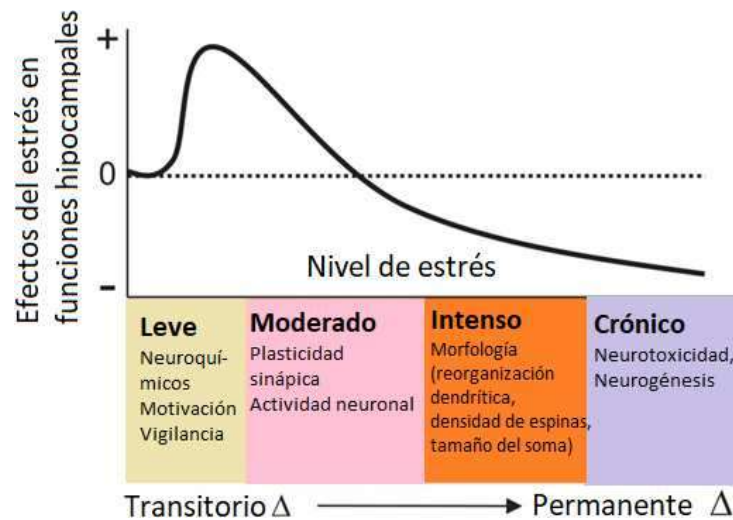


Fig. 8 Efectos biológicos del estrés sobre el hipocampo. Las neuronas del hipocampo son altamente plásticas. Si son sometidas a algún estímulo estresante crónico, cambian su citoarquitectura, morfología y neurogénesis, entre otros (Lupien *et al.*, 2009). Estos efectos del estrés pueden influir en funciones cognitivas, como el aprendizaje y la memoria contribuyendo a psicopatologías. + y - representan un aumento y disminución del hipocampo y su funcionamiento, respectivamente (Adaptado de Kim y Yoon, 1998).

IV. HIPÓTESIS

La incubación de los huevos en NH disminuye el proceso de proliferación e integración neuronal en la tortuga golfina (*L. olivacea*) en el momento de la emergencia.

V. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la incubación en NH sobre la proliferación y la densidad neuronal en la zona ventricular y corteza cerebral en el momento de la emergencia de la tortuga golfina (*L. olivacea*).

Particulares

- a. Caracterizar el microambiente de NN y NH de *L. olivacea*
- b. Evaluar el efecto de la incubación en NH sobre la proliferación postnatal en el surco lateral (sl) y surco septo medial (ssm) de la zona ventricular de *L. olivacea*
- c. Evaluar el efecto de la incubación en NH sobre la densidad neuronal en la corteza dorsomedial (Cdm) y medial (Cm) en crías de *L. olivacea*.

VI. CAPITULO I

Negative effects on neurogenesis, ovariogenesis and fitness in sea turtle hatchlings associated to ex – situ conservation management

Publicado en *Frontiers in Ecology and Evolution*.2022. doi:
10.3389/fevo.2022.850612



Negative Effects on Neurogenesis, Ovariogenesis, and Fitness in Sea Turtle Hatchlings Associated to *ex situ* Incubation Management

Nancy M. Unda-Díaz¹, Bryan V. Phillips-Farfán², Hector Nava¹, Leonel Lopez-Toledo¹, Chiharu Murata³, Naima Lajud⁴, Ma. Antonia Herrera-Vargas¹, Claudia A. Arreola Camacho¹, Luz Torner⁴, Alma L. Fuentes-Farías^{1*} and Esperanza Meléndez-Herrera^{1*}

¹ Departamento de Zoología, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico, ² Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico, ³ Departamento de Metodología de la Investigación, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico, ⁴ División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Jeanine M. Refsnider,
University of Toledo, United States

Reviewed by:

Nathan Freeman Putman,
LGL, United States
Jeanette Wyneken,
Florida Atlantic University,
United States

*Correspondence:

Esperanza Meléndez-Herrera
emelendez@umich.mx
Alma L. Fuentes-Farías
alma.fuentes@umich.mx

Specialty section:

This article was submitted to Behavioral and Evolutionary Ecology, a section of the journal Frontiers in Ecology and Evolution

Received: 07 January 2022

Accepted: 12 May 2022

Published: 13 June 2022

Citation:

Unda-Díaz NM, Phillips-Farfán BV, Nava H, Lopez-Toledo L, Murata C, Lajud N, Herrera-Vargas MA, Arreola Camacho CA, Torner L, Fuentes-Farías AL and Meléndez-Herrera E (2022) Negative Effects on Neurogenesis, Ovariogenesis, and Fitness in Sea Turtle Hatchlings Associated to *ex situ* Incubation Management. *Front. Ecol. Evol.* 10:850612. doi: 10.3389/fevo.2022.850612

Sea turtle egg relocation and hatchery incubation (hereafter termed *ex situ* incubation) is an effective strategy to protect clutches when *in situ* egg incubation is not viable. Nevertheless, it negatively affects the ontogenesis of male gonads and brain areas homologous to the mammalian hippocampus, as well as body size and fitness. Thus, it is imperative to analyze the effects of *ex situ* incubation on other developmental aspects and extend these observations to females. This work evaluated the effect of *ex situ* management on neurogenesis (cell proliferation in the dorsal and medial ventricular zones, neuronal integration in the dorsomedial and medial cortices), ovary cell proliferation, body size (mass and length) and self-righting ability. Additionally, this study examined if the incubation microenvironment is different between *in situ* and *ex situ* nests and whether it could contribute to explain the biological traits. An analysis of principal components showed differences in biological variables of hatchlings between *in situ* and *ex situ* clutches, driven by contrasting temperatures and silt composition. Each biological variable was also analyzed with linear mixed models using *in situ* vs. *ex situ* clutches, abiotic variables and their interaction. Turtles from *ex situ* clutches showed: (1) fewer proliferating cells in the dorsal and medial ventricular zones; (2) less mature neurons in the dorsomedial and medial cortices; (3) ovaries with a lesser number of proliferating cells; (4) lower body mass and length at emergence; and (5) slower self-righting time. Together, the results suggest that *ex situ* incubation in hatcheries is related to a slowing down of neurogenesis, ovariogenesis, body size and self-righting ability in hatchlings. Future studies should evaluate the effect of *ex situ* incubation on cognitive and reproductive performance to understand the long-term consequences of altered organogenesis. These studies should also disentangle the differential contribution of egg movement, reburial, nesting environment and parental origin to development. This information would likely result in better conservation strategies for sea turtles.

Keywords: *Lepidochelys olivacea*, brain development, ovarian development, neuronal integration, temperature, substrate composition, moisture

INTRODUCTION

Natural sea turtle populations are threatened globally (IUCN, 2020). Conservation efforts implemented in the last decades have gradually managed to mitigate the loss of some populations with scarce effect on others (Mazaris et al., 2017). One of the most broadly employed strategies is the relocation of endangered eggs to protected hatcheries. Eggs continue their development in *ex situ* nests constructed near the original site selected by the mother. This strategy has shown considerable success and may be the only chance for survival in some species of major concern (Blanck and Sawyer, 1981; Heppell et al., 2005, 2007; Mazaris et al., 2017).

However, several studies have reported negative effects associated to *ex situ* protection such as diminished hatching success, incomplete yolk resorption, sexual ratio bias, low body mass or length and reduced locomotor performance at emergence (Limpus et al., 1979; Eckert and Eckert, 1990; Pintus et al., 2009; Maulany et al., 2012; McElroy et al., 2015; Ahles and Milton, 2016; Tanabe et al., 2020). Recent studies evaluated the impact of the *ex situ* incubation strategy on organogenesis and proposed potential mechanisms of action for its negative effects (Sönmez et al., 2011; Herrera-Vargas et al., 2017).

Some studies explored the causal effect of abiotic variables on developmental traits (Sieg et al., 2011). A chief variable is nest temperature (Telemeco et al., 2013), which modifies incubation duration (Merchant-Larios et al., 1997; Booth and Astill, 2001a,b), sex determination (Reece et al., 2002), immune competence (Freedberg et al., 2008; Dang et al., 2015; Robledo-Avila et al., 2022) and brain development in reptiles (Amiel and Shine, 2012; Paredes et al., 2016; Amiel et al., 2017; Sanger et al., 2018). Another important factor is nest moisture, which alters sex ratio, incubation duration and embryo growth (Wallace et al., 2004; Patino-Martínez et al., 2012; Lolavar and Wyneken, 2020; Tezak et al., 2020). Successful sea turtle embryo development also depends on substrate composition, which could affect gas exchange and water retention, as well as the incubation period and sex-ratio (Ackerman, 1977; Lutcavage et al., 1997; Mitchell and Janzen, 2019).

The brain is a plastic organ; its early development is affected by external factors, such as temperature and moisture in ectotherms (Coomber et al., 1997; Beltrán et al., 2021; Sanger et al., 2021). This is especially true for the hippocampus, a structure that participates in cognitive tasks such as spatial learning and memory (Suh et al., 2011; Bannerman et al., 2014), as well as in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Sapolsky et al., 1983, 1984). Anatomical and genetic results suggest that the reptilian dorsomedial cortex is homologous to the mammalian CA1/CA3 hippocampal regions; whereas the medial cortex corresponds to the dentate gyrus (Medina et al., 2017; Tosches et al., 2018). Development of these cortices results from proliferation of neural precursors in the dorsal and medial walls of the lateral ventricles (Butler and Hodos, 2005; Medina et al., 2017; McDonald and Vickaryous, 2018; Tosches et al., 2018).

Proliferation is the earliest step in neurogenesis, which is followed by migration, differentiation, and integration of these

new cells into the neural tissue (Altman and Das, 1965; Gage, 2002; Bayer and Altman, 2004; Kuhn et al., 2016). In mammals, early adverse environmental conditions can induce long-lasting brain alterations, including reduced hippocampal neurogenesis (Lajud and Torner, 2015; Vaiserman and Koliada, 2017). These alterations could result in lifelong cognitive and affective deficits, such as learning and memory disabilities, as well as anxiety-like or depressive-like behaviors (Heim and Nemeroff, 2002; McEwen, 2012; Lajud and Torner, 2015; Vaiserman and Koliada, 2017). Interestingly, species-specific non-optimal incubation temperatures decrease hippocampal neurogenesis in lizards, producing spatial learning disabilities (Amiel and Shine, 2012; Amiel et al., 2017; Dayananda and Webb, 2017). Likewise, early non-optimal conditions produce anxiety-like behaviors in lizards (Trnik et al., 2011), suggesting that reduced hippocampal neurogenesis during critical time windows may alter cognitive and behavioral traits in both mammals and reptiles.

Similarly, early environmental conditions also influence the development of the gonad. Its differentiation in reptiles displays the same progression as in other vertebrates and is highly sensitive to environmental variables such as temperature (Yntema and Mrosovsky, 1981; Ge et al., 2018; Weber et al., 2020). In humans and mice, altered seminiferous cord formation is associated with infertility, dysgenesis, and sexual development disorders (Chen and Liu, 2016). Likewise, disturbed oogenesis and folliculogenesis is related to reduced follicle reserves and infertility (Holm et al., 2016).

Motor abilities such as self-righting, crawling, and swimming speed constitute developmental traits associated with microenvironmental incubatory conditions like temperature and grain size. Better performance has been associated with cooler incubation temperatures and medium grain sand (Stewart et al., 2019; Reboul et al., 2021). Since reduced motor skills increase predation risk for newly emerged hatchlings during their displacement on land and sea, these traits constitute a good indicator of physical fitness and survival during this period. Indeed, these abilities may be good indicators of non-optimal incubation conditions in sea turtles (Fleming et al., 2020; Martins et al., 2020).

Ex situ incubation may alter neural and gonadal development in male *Lepidochelys olivacea* hatchlings by reducing the cell size and dendritic arborization of dorsomedial cortical neurons, as well as the number of epithelial cells per seminiferous cord (Herrera-Vargas et al., 2017). The functional relevance of these alterations is unknown, but results in mammals and lizards suggests that defective differentiation of hippocampal neurons and the seminiferous cord causes cognitive and reproductive problems (see above). Studies in rodents suggest that males are more vulnerable to developmental disruption (Dimatelis et al., 2015; Cowan and Richardson, 2018; de Melo et al., 2018), but in ectotherms some studies associate better phenotypes with male-producing environmental conditions (Freedberg et al., 2008).

Neurogenesis, ovariogenesis and motor performance are vital for the survival of sea turtle populations. These processes are highly sensitive to early adverse environmental stimuli. *Ex situ* incubation in hatcheries involves the early handling of eggs, as well their relocation to hatcheries. Moreover, nesting beaches

include microenvironments that vary in moisture (depending on distance to the shoreline or vegetation), substrate composition, microbial load, and temperature (Stewart et al., 2019). All these variables could contribute to create non-optimal conditions for suitable development of turtle hatchlings. Thus, it is necessary to evaluate the effects of *ex situ* incubation in female turtles to determine if early adverse conditions have sex-specific effects on developmental traits. Moreover, it is imperative to identify the environmental variables likely modifying these developing traits in sea turtles. To test these hypotheses, this study evaluated the effects of *ex situ* incubation on hippocampal neurogenesis (cell proliferation in the dorsal and medial ventricular zones, as well as integration of newborn neurons into the dorsomedial and medial cortices), ovariogenesis (cell proliferation), body size (mass and length), and self-righting ability in *L. olivacea* females at emergence. Furthermore, this work analyzed the contribution of several nest-related abiotic variables (sand temperature, moisture, and grain size) to identify the most relevant variables for hatchling development. The results will contribute to determine the impact of *ex situ* incubation in hatcheries on female organogenesis and to identify some of the variables determining the altered phenotype observed in turtles incubated in hatcheries.

MATERIALS AND METHODS

Study Site and Nesting Conditions

This study was conducted at the *Centro de Protección de la Tortuga Marina* in Boca Seca beach, located in Lázaro Cárdenas, Michoacán, México (18° 04' N, 102° 58' W; **Figure 1**). Egg manipulation was kept to the bare minimum and done by the hatchery staff according to protocols stated in Mexican regulation (NOM-162-SEMARNAT, 2012) and a previous report (Herrera-Vargas et al., 2017). Briefly, beach patrolling during three consecutive nights (September 13–15, 2017) allowed identification of nesting females. Ten nests located approximately in the same beach zone (30–60 m away from the shoreline) were chosen and sheltered immediately after the female turtle covered the eggs and left the site. Five randomly selected natural nests remained undisturbed *in situ*, only fenced with cyclone mesh until hatchling emergence. The complete clutch of the other five nests was carefully collected as soon as the female left the nest, placed in individual plastic bags and transported to the hatchery. There, the eggs were immediately buried in previously built nests and remained undisturbed until emergence. This ensured that conditions related to clutch size (e.g., oxygen availability, temperature, metabolic heat, etc.) remained unaltered. The total time between laying and re-burial lasted less than 2 h. Efforts were made to avoid egg rotation and excessive handling, as well as to emulate natural nest architecture in hatcheries. *Ex situ* nests were constructed by the hatchery staff according to international norms for *L. olivacea*, with a narrow neck (20–25 cm) and a wider flask-shaped bottom, at a depth of 40–50 cm and 1 m separation between them (Kutzari, 2006). Nests from both conditions were not shaded or watered. Forty days after incubation started, the hatchery clutches were fenced with cyclone mesh until turtle

emergence. This experimental design ensured that *in situ* nests were not disturbed and that clutches relocated to hatcheries only went through the routine procedures done by the hatchery staff. Egg handling was performed before organogenesis started (Miller, 1985).

Hatchling Collection

Animal sampling, handling and sacrifice protocols were approved by an Animal Rights Committee, under License Number SEMARNAT: SGPA/DGVS/10395/17; in accordance with Mexican regulation (NOM-033-SAG/ZOO, 2014). One hundred and fifty turtles were collected from five *in situ* and five *ex situ* nests (15 hatchlings/nest). Fifty hatchlings were used for histological and morphometric observations: for neurogenesis studies, 24 brains per nest type were evaluated, since one brain for each condition was damaged during dissection (48 brains in total); for ovarian cell proliferation quantification, at least two ovaries per nest were used (27 ovaries in total), while all fifty individuals were sexed. The other one hundred hatchlings were used to evaluate motor performance.

Hatchling collection was described by Herrera-Vargas et al. (2017) and Robledo-Avila et al. (2022). Briefly, fifteen emerging turtles from each nest were collected at 5-min intervals, as soon as they surfaced from each nest. Five randomly selected hatchlings per nest were weighted with a digital precision balance (OHAUS™ Scout Pro Sp 602, Max 600 g, $d = 0.01$ g). Their straight carapace length was measured using a digital Vernier caliper (Mitutoyo™). These same five turtles per nest were used to investigate neurogenesis and gonadal cell proliferation.

Cell Proliferation and Neuronal Integration Studies

To evaluate the effect of *ex situ* incubation on brain and ovary cell proliferation, hatchlings received an intraperitoneal injection of the cell birth marker 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, a thymidine analog incorporated in the S phase of the cell cycle. Sigma-Aldrich, 100 mg/Kg in 0.9% NaCl) immediately after morphometric data recording and a second injection 2 h after. Turtles were then placed in sand tubs and sacrificed 4 h after the last injection. This procedure (i.e., the timings) minimized the effect of factors other than the incubation condition on cell proliferation. The brain and gonad-mesonephros complex were dissected *in situ*, incubated in Bouin's solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States) for 24 h and incubated in buffered paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States, 4% in 0.1 M phosphate buffer) for 3 days at room temperature.

In the laboratory, brains were rinsed with 70% ethanol and transferred to buffered sucrose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States, 30% in 0.1 M phosphate buffer) at 4°C until they sank. Then they were frozen in the Peltier module of a cryostat (Microm) and sectioned coronally at 30 μ m. Free-floating sections were collected in Tris-buffered saline (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) and processed for immunohistochemistry. Cell proliferation in neurogenic niches was evaluated by

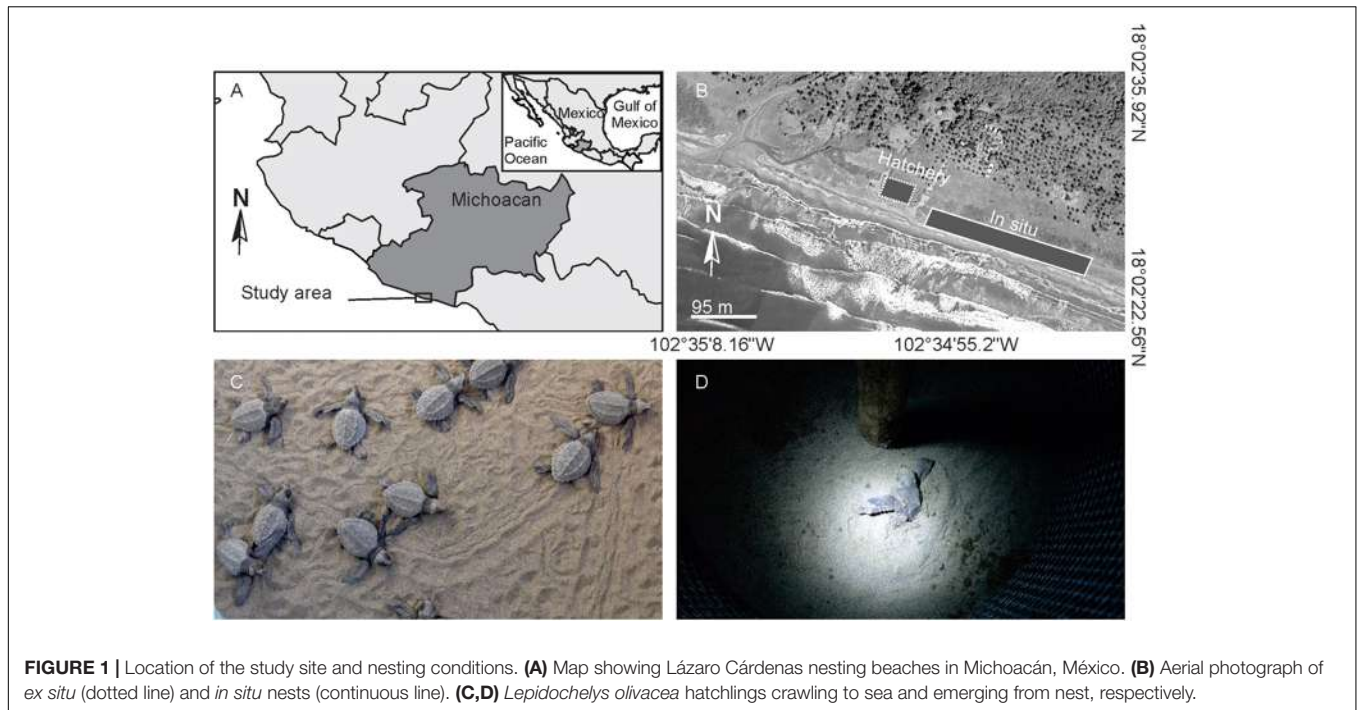


FIGURE 1 | Location of the study site and nesting conditions. **(A)** Map showing Lázaro Cárdenas nesting beaches in Michoacán, México. **(B)** Aerial photograph of *ex situ* (dotted line) and *in situ* nests (continuous line). **(C,D)** *Lepidochelys olivacea* hatchlings crawling to sea and emerging from nest, respectively.

immunoreactivity for BrdU and neuronal integration was evaluated by immunoreactivity for the anti-neuronal nuclear protein (NeuN) in separate brain sections. Briefly, the tissue was incubated in ImmunoDNA retriever 20× with citrate (Bio SB), then in 2 N HCl for 30 min at 65°C and finally in 0.1 M sodium borate buffer at room temperature. Blocking of non-specific binding was done by incubating the sections in 0.1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States) for 30 min. Sections including the dorsal and medial ventricular zones were incubated with mouse anti-BrdU monoclonal antibody (1: 500, Roche) and independent cortical sections were incubated with mouse anti-NeuN monoclonal antibody (1: 1000, Millipore) for 16 h at 4°C. Then they were incubated with a donkey anti-mouse biotin-conjugated secondary antibody (1:500, Vector Laboratories) for 2 h. Sections were incubated in avidin/biotin horseradish peroxidase (Vectastain Elite, PK-6100) for 2 h at room temperature and then incubated in diaminobenzidine as a chromogen, with peroxide and buffer for 10 min (Vector Staining Kit, SK-4100). Finally, the tissue was mounted onto gelatinized slides, dehydrated and cover-slipped using Cytoseal 60 (Richard Alan Scientific).

To evaluate cell proliferation in neurogenic niches, three equivalent non-adjacent brain sections containing the dorsal and medial ventricular zones were selected per turtle according morphological criteria (appearance of lateral ventricles) along the antero-posterior axis. BrdU + immunoreactive cells were quantified in two microphotographs per section per neurogenic zone at 1000× magnification. To evaluate neuronal integration, three equivalent non-adjacent brain sections including the dorsomedial and medial cortices were selected per turtle according morphological criteria (opening of the lateral ventricles). NeuN + immunoreactive cells in the cellular layer

were quantified in three microphotographs per section per cortex at 1000× magnification. Microphotographs were captured with a Zeiss microscope using the Axio Vision 4.6 software and analyzed using NIH ImageJ software.

For gonadal sex determination, one gonad-mesonephros complex was dehydrated using increasing ethanol concentrations, embedded in paraffin, sliced transversally (7 μm) in a microtome (Leica) and stained with hematoxylin-eosin (Merck), as previously described (Herrera-Vargas et al., 2017). Gonadal histology showed that all fifty specimens were females, thus all gonadal analysis were performed in ovaries. To evaluate ovarian cell proliferation, at least two gonad-mesonephros complexes per nest were frozen, cryosectioned at 30 μm and immuno-stained for BrdU as described for the brain (the other gonad-mesonephros complexes were frozen for RNA quantification). Five adjacent gonadal sections per hatchling were selected from the central ovary. BrdU + immunoreactive germ cells were quantified in the cortex of ovaries throughout the whole section at 400 x magnification, as described for brain sections. After quantification, selected ovarian sections were stained with hematoxylin-eosin to observe cell density and cytoarchitecture.

Self-Righting

To evaluate the effect of *ex situ* incubation on motor skills, ten hatchlings per nest were randomly selected and separated in tubs with sand for 15 min, to prevent lethargy from interfering with performance (Booth et al., 2013). Turtles were placed upside-down on a tray full of dry sand and the time they took to self-right was recorded with a chronometer (Sper scientific 810015 5 channel timer). Hatchlings that exceeded 10 min to self-right

were discarded from the analysis. Thus, 48 turtles from *in situ* nests and 31 *ex situ* hatchlings were analyzed.

Measurement of Abiotic Variables

To evaluate the contribution of abiotic variables to the developmental traits, nest temperature, moisture and sand grain size were determined. Nest temperature was recorded from developmental day 11 until emergence, since this period includes the bulk of hippocampal neurogenesis previously described for *Emys orbicularis* (Goffinet et al., 1986) and the critical time for gonadal development in *L. olivacea* (Merchant-Larios et al., 1997). Temperature was registered by data loggers (Onset HOBO® Bluetooth Pendant MX2202 series; accuracy $\pm 0.2^\circ\text{C}$) carefully located outside the nest to avoid disturbing the clutch. They were placed in sand 30 cm from the center of the nest and 50 cm deep, 11 days after the incubation period began. They were programmed to record the temperature every hour; results were averaged by nest.

Moisture and grain size were determined from 100 g of sand, sampled 10 cm deep inside the nests, immediately after hatchling emergence. The sand was placed in a sealed plastic bag, weighed, dried at $105\text{--}110^\circ\text{C}$ in a standard oven and weighed again. Moisture content was calculated as the ratio of wet to dry sand mass (Head, 1992). Grain size analysis was performed by particle sieving, using international parameters (gravel: > 2.0 ; coarse sand: 2.0 ± 0.2 ; fine sand: 0.2 ± 0.02 ; silt: $0.02\text{--}0.002$ mm; Brady and Weil, 2008), and subsequent weighting with an analytical balance. Gravel, coarse- and fine-sand, as well as silt proportions were calculated dividing by the total dry mass (Gee and Or, 2002).

Statistical Analyses

Preliminary analysis showed that only one nest had a different gravel composition from the rest, thus gravel was discarded from further examination. Similarly, fine sand was collinear with coarse sand, hence only the latter was used. This was done because multivariate analyses are sensitive to collinearity between variables, which causes interpretation problems (Harrison et al., 2018). Accordingly, the selected parameters for analysis were abiotic variables within nests (temperature and moisture, coarse sand and silt), as well as turtle biological variables (cell proliferation in the dorsal and medial ventricular zones, as well as the ovary; neuronal integration in the cellular layer of the dorsomedial and medial cortices; body mass and length, as well as self-righting time).

Multivariate principal components analysis (PCA) was performed to reduce data dimensionality and investigate the distribution of samples in two-dimensions. This allowed the assessment of possible differences between conditions, based on the abiotic variables within nests and turtle biological data.

The outcomes of *in situ* ($n = 5$) vs. *ex situ* clutches ($n = 5$), abiotic variables and their interaction (*in situ* vs. *ex situ* condition interacting with each abiotic variable) were studied with linear mixed models to avoid violation of independence assumptions (turtles within clutches). Biological results were used as the response variables in these models; which included the following effects: *in situ* vs. *ex situ* clutches (main); abiotic variables and their interaction (fixed) plus turtles within clutches (random).

All abiotic variables (temperature, moisture, coarse sand and silt) were standardized by subtracting the mean from every value and dividing by the standard deviation (Harrison et al., 2018), due to wide differences in their ranges. Outliers were removed from most turtle biological data (all except body mass and length). Ovarian cell proliferation and self-righting were also transformed to meet normality and homocedasticity assumptions; with square-root and natural logarithm, respectively.

Stepwise backward elimination followed by selection with the conditional Akaike information criterion (cAIC) were performed to obtain the best linear mixed model (**Supplementary Data 1**). The marginal R^2 for each model was determined as a measure of the proportion of the variance explained by the model. The effect size for *in situ* vs. *ex situ* clutches was evaluated by Glass's Δ (Sink and Mvududu, 2010; Sullivan and Feinn, 2012). Graphs presented in the results for each of the eight biological variables were obtained back-transforming the predictions of the final models. Residuals for each model were plotted to assess the distribution of the model fit (**Supplementary Data 1**).

Data analyses were done using R (R Core Team, 2020; version 4.1.1) and RStudio (RStudio Team, 2020; version 1.3.1073). Linear mixed models were performed using: readxl (Wickham and Bryan, 2019), lme4 (Bates et al., 2015), lmerTest (Kuznetsova et al., 2017), and cAIC (Säefken et al., 2018). Model parameters, including residuals, were evaluated with the performance package (Lüdtke et al., 2021). Principal component analysis results were graphed with ggbiplot (Vu, 2011).

RESULTS

Data provided by the national meteorological service during the entire incubation period (September 13–October 31, 2017) showed an average environmental temperature of $26.41^\circ\text{C} \pm 0.98$ SD (mean minimum temperature = 20.53°C and mean maximum temperature = 32.27°C ; **Supplementary Table 1**). Data loggers in sand near the nests recorded average maximum temperatures of $35.68^\circ\text{C} \pm 0.83$ SD for *in situ* nests and $37.03^\circ\text{C} \pm 1.29$ SD for *ex situ* nests, as well as mean minimum temperatures of 26.28 ± 2.91 SD for *in situ* nests and 25.01 ± 0.14 SD for *ex situ* nests (**Table 1**). The average incubation period \pm SD for hatchlings from *in situ* clutches was 46.40 ± 0.55 and 45.60 ± 1.82 days for hatchlings from *ex situ* clutches (**Table 1**). The mean moisture, coarse and fine sand, as well as silt proportions were: *in situ* (0.1180 ± 0.0936 SD; 0.9238 ± 0.0363 SD; 0.0643 ± 0.0384 SD; and 0.0005 ± 0.0008 SD, respectively) and *ex situ* clutches (0.0980 ± 0.0487 SD; 0.9011 ± 0.0176 SD; 0.0880 ± 0.0156 SD; and 0.0062 ± 0.0041 SD, respectively; **Supplementary Table 2**).

The PCA suggested that the synergic effect of some or all abiotic variables may be important to determine turtle phenotypes (see below). The first two principal components of the PCA, based on the biological and abiotic variables, explained 71.7% of the total data variance (**Figure 2** and **Supplementary Table 3**). Principal component 1 (52%) showed that coarse sand ($r = -0.202$) and moisture ($r = -0.122$) were higher for *in situ* nests, while temperature ($r = 0.304$) and silt ($r = 0.295$) were lower. In addition, all biological variables from hatchlings (except

TABLE 1 | Sand temperatures (°C) monitored by data loggers located 30 cm from the center of the clutch and 50 cm deep, as well as incubation periods registered for *L. olivacea* hatchlings at Boca Seca beach, Lázaro Cárdenas, Michoacán, México.

Nest no.	Incubation condition	Incubation period			Incubation dates	Incubation days
		Mean temperature ± SEM	Maximum temperature	Minimum temperature		
1	<i>in situ</i>	34.17 ± 0.75	35.44	31.47	15/09–30/10	46
2	<i>in situ</i>	33.19 ± 1.26	34.90	24.93	15/09–30/10	46
3	<i>in situ</i>	34.15 ± 1.50	36.51	25.22	15/09–30/10	46
4	<i>in situ</i>	34.24 ± 1.66	36.40	25.03	15/09–31/10	47
5	<i>in situ</i>	32.64 ± 1.21	34.69	24.74	15/09–31/10	47
6	<i>ex situ</i>	34.36 ± 1.49	36.30	24.93	13/09–30/10	48
7	<i>ex situ</i>	34.50 ± 1.68	36.95	25.22	14/09–31/10	47
8	<i>ex situ</i>	34.38 ± 1.47	36.30	25.03	15/09–29/10	44
9	<i>ex situ</i>	35.12 ± 2.18	39.28	24.84	15/09–29/10	44
10	<i>ex situ</i>	34.42 ± 1.49	36.30	25.03	15/09–30/10	45

Nest no.	Incubation condition	Thermosensitive period		
		Mean temperature ± SEM	Maximum temperature	Minimum temperature
1	<i>in situ</i>	32.98 ± 0.68	34.06	31.98
2	<i>in situ</i>	32.14 ± 1.22	33.95	24.93
3	<i>in situ</i>	32.96 ± 1.53	35.22	25.22
4	<i>in situ</i>	32.61 ± 1.34	34.59	25.03
5	<i>in situ</i>	31.69 ± 1.17	33.43	24.74
6	<i>ex situ</i>	33.49 ± 1.71	35.65	24.93
7	<i>ex situ</i>	33.41 ± 1.84	35.97	25.22
8	<i>ex situ</i>	33.20 ± 1.68	35.33	25.03
9	<i>ex situ</i>	33.04 ± 1.53	34.69	24.84
10	<i>ex situ</i>	33.38 ± 1.62	35.33	25.03

The table shows temperatures registered from incubation day 11 until emergence (incubation period) and during the thermosensitive period per clutch (*in situ*, n = 5; *ex situ*, n = 5).

self-righting) were higher for *in situ* conditions (Figure 2 and Supplementary Table 3). Principal component 2 (20%) showed that moisture ($r = -0.543$) and coarse sand proportions ($r = -0.300$) most influenced environmental variation for *in situ* nests (Figure 2 and Supplementary Table 3).

Principal components analysis results showed a clear difference between nest conditions. Thus, linear mixed models were performed to confirm these differences and explore their relationship to abiotic variables. Linear mixed models showed that *ex situ* nests were negatively related to *L. olivacea* development at nest emergence with moderate (Glass’s $\Delta < 1$) to very large effect sizes (Glass’s $\Delta > 1.3$; Sullivan and Feinn, 2012; Table 2). The simplest linear mixed models (*in situ* vs. *ex situ* nests and intercept) were the best fit for all biological variables (Table 2). Additionally, models with each abiotic variable alone (i.e., without *in situ-ex situ* factor) were performed for each biological variable. In all cases, the cAIC was better with the *in situ-ex situ* factor than with only one abiotic variable (Supplementary Data 1). Altogether, linear mixed models indicated that abiotic variables (temperature, moisture, and the proportion of different sediment sizes) did not individually affect any response variables, at least when using backward elimination and the lowest conditional AIC to select the best model.

In situ hatchlings showed on average 253.72 and 502.09 more proliferating cells in the dorsal (*in situ*: 491.04 ± 186.63 vs. *ex situ*: 237.32 ± 158.5 BrdU + cells/mm² mean ± SD; $p = 0.014$) and medial ventricular zones (*in situ*: 1005.45 ± 468.77 vs. *ex situ*: 503.36 ± 333.62 BrdU + cells/mm² mean ± SD; $p = 0.031$), respectively (Figure 3 and Table 2) than *ex situ* incubated offspring. They also showed on average 148.26 and 664.82 more mature neurons in the dorsomedial (*in situ*: 2033.85 ± 151.42 vs. *ex situ*: 1885.59 ± 157.67 NeuN + cells/mm² mean ± SD; $p = 0.041$) and medial cortices (*in situ*: 2061.57 ± 283.11 vs. *ex situ*: 1396.75 ± 541.07 NeuN + cells/mm² mean ± SD; $p = 0.001$), respectively (Figure 4 and Table 2) than *ex situ* hatchlings. The best models for dorsal and medial ventricular zone cell proliferation explained 33 and 28% of the data variation, while those for the dorsomedial and medial cortices explained 18 and 37% of the data variation (Table 2).

The ovaries from *in situ* incubated hatchlings showed on average 11.99 more proliferating cells (*in situ*: 13.28 ± 2.21 vs. *ex situ*: 1.29 ± 1.38 BrdU + cells/mm² mean ± SD; $p < 0.001$; Figure 5 and Table 2) in comparison with ovaries from *ex situ* offspring. The best model for ovarian cell proliferation explained 89% of the data variation (Table 2). Cell density and architecture were evaluated in sections with hematoxylin/eosin

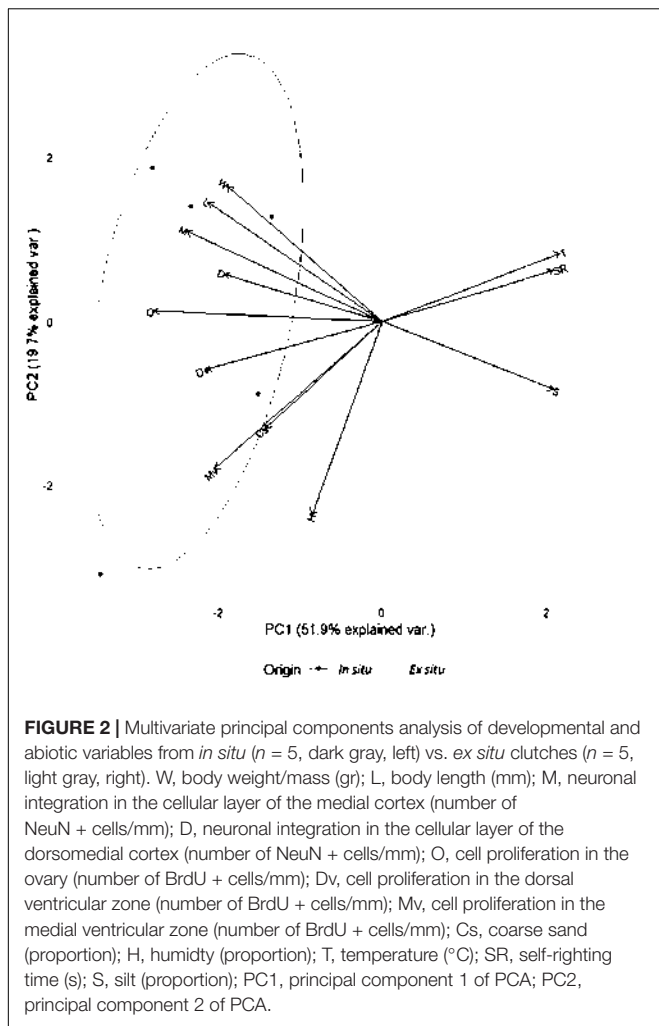


FIGURE 2 | Multivariate principal components analysis of developmental and abiotic variables from *in situ* ($n = 5$, dark gray, left) vs. *ex situ* clutches ($n = 5$, light gray, right). W, body weight/mass (gr); L, body length (mm); M, neuronal integration in the cellular layer of the medial cortex (number of NeuN + cells/mm); D, neuronal integration in the cellular layer of the dorsomedial cortex (number of NeuN + cells/mm); O, cell proliferation in the ovary (number of BrdU + cells/mm); Dv, cell proliferation in the dorsal ventricular zone (number of BrdU + cells/mm); Mv, cell proliferation in the medial ventricular zone (number of BrdU + cells/mm); Cs, coarse sand (proportion); H, humidity (proportion); T, temperature ($^{\circ}$ C); SR, self-righting time (s); S, silt (proportion); PC1, principal component 1 of PCA; PC2, principal component 2 of PCA.

staining after BrdU quantification, but it was not possible to quantify the number of ovarian cells due to section thickness (Supplementary Figure 1).

Turtles from *in situ* clutches were on average 1.66 g heavier (*in situ*: 17.65 ± 1.35 g vs. *ex situ*: 15.99 ± 1.1 g mean \pm SD; $p = 0.041$; **Figure 6A** and **Table 2**), and 3.34 mm larger than *ex situ* offspring (*in situ*: 67.22 ± 2.50 mm vs. *ex situ*: 63.88 ± 2.33 mm mean \pm SD; $p = 0.012$; **Figure 6B** and **Table 2**). Additionally, *in situ* incubated hatchlings were on average 5.49 s faster for self-righting (*in situ*: 2.56 ± 8.45 s vs. *ex situ*: 8.05 ± 6.90 s mean \pm SD; $p = 0.007$; **Figure 6C** and **Table 2**) than *ex situ* hatchlings. The best model for body mass explained 31% of the data variation, while the model for body length explained 32% of the data variation and that for self-righting explained 26% of data variation (**Table 2**).

DISCUSSION

This work shows that *ex situ* protection of eggs in hatcheries can result in developmental deficits (compared to *in situ* nests) in female hatchlings, expanding our prior report in males (Herrera-Vargas et al., 2017). Herein, the *ex situ* incubation strategy

was related to negative effects on neurogenesis, ovariogenesis, body size, and motor performance. Turtles from *ex situ* clutches showed lower cell proliferation in the ovary and neurogenic niches, as well as fewer differentiated neurons in brain areas homologous to the mammalian CA1/CA3 hippocampal regions and dentate gyrus. Additionally, newly hatched turtles from *ex situ* clutches showed lower body size and lesser motor abilities. Many factors could potentially account for the negative effects of *ex situ* incubation on offspring development. This study focused on the nest microenvironment (sand temperature, moisture, and sediment particle size). The PCA showed that this microenvironment was related to turtle phenotypes. However, the isolated contribution of the different abiotic variables to development could not be disentangled. A main limitation of this study was an impossibility to differentiate the effects of hatchery incubation from the effects of egg movement and reburial as well as genetic factors (i.e., parental origin). Of note, this study used a relatively small number of nests over a relatively narrow, but important, temperature range.

Ex situ Protection in Hatcheries Is Associated With a Lower Rate of Neurogenesis in Turtle Hatchlings

To evaluate the effect of *ex situ* incubation while minimizing the effect of turtle retention, two important events for early neurogenesis were evaluated 6 h after nest emergence: cell proliferation in neurogenic niches and neuron integration in cortices homologous to the mammalian hippocampus. The results showed that the *ex situ* incubation strategy is associated with a lower number of proliferating cells and differentiated neurons in turtle hatchlings. In vertebrates, hippocampal neurogenesis is a highly regulated process that includes cell proliferation, migration, differentiation and integration (Altman and Das, 1965; Gage, 2002; Bayer and Altman, 2004; Kuhn et al., 2016; McDonald and Vickaryous, 2018). Proper development of the mammalian hippocampus is required to achieve ecologically relevant cognitive tasks such as spatial learning and memory, as well as to regulate emotional responses (Gould et al., 1999; Deng et al., 2010).

In reptiles, newly born cells from the dorsal and lateral ventricular zones migrate radially for several days and mature as neurons as they approach the cortices. Neurogenic niches in the postnatal gecko brain produce neurons exclusively (McDonald and Vickaryous, 2018). Thus, it is highly likely that the BrdU + cells we observed herein were neuronal progenitors. Nonetheless, future cell-fate mapping studies should confirm the lineage of BrdU + cells produced in newly emerged sea turtles. In this study, BrdU + cells were only present lining the ventricular walls in both conditions, confirming the idea that proliferating neurons migrate several days after birth.

Offspring from *ex situ* clutches showed fewer BrdU + proliferating cells early after nest emergence, suggesting that a lower number of neural precursors will migrate to hippocampal cortices postnatally. Thus, less neurons (or glial cells) differentiate and integrate into functional circuits. Similarly, the lower density of NeuN + cells observed in the

TABLE 2 | Summary of the best linear mixed effect models for each variable, selected by cAIC, explaining biological variables of *Lepidochelys olivacea* in situ vs. ex situ hatchlings.

Best model	$\beta \pm SE$	d.f.	F	p	ES	R ²
Dorsal ventricular zone-cell proliferation (# BrdU + cells/area)						
Intercept	483.05 ± 56.13			<0.001		0.33
in situ vs. ex situ	-244.92 ± 78.21	8.15	9.81	0.014	2.63	
*Medial ventricular zone-cell proliferation (# BrdU + cells/area)						
Intercept	991.31 ± 144.94			<0.001		0.28
in situ vs. ex situ	-534.39 ± 204.97	7.96	6.80	0.031	1.72	
Dorsomedial cortex-neuronal integration (# NeuN + cells/area)						
Intercept	2031.77 ± 43.73			<0.001		0.18
in situ vs. ex situ	-145.82 ± 60.89	8.78	5.73	0.041	3.25	
Medial cortex-neuronal integration (# NeuN + cells/area)						
Intercept	2062.49 ± 97.28			<0.001		0.37
in situ vs. ex situ	-665.58 ± 136.35	8.57	23.83	0.001	52.46	
Ovary-cell proliferation (# BrdU + cells/area)						
Intercept	3.64 ± 0.18			<0.001		0.89
in situ vs. ex situ	-2.56 ± 0.26	7.61	99.31	<0.001	24.71	
Body mass (g)						
Intercept	17.72 ± 0.50			<0.001		0.31
in situ vs. ex situ	-1.73 ± 0.71	7.96	5.97	0.041	1.48	
Body length (mm)						
Intercept	67.27 ± 0.73			<0.001		0.32
in situ vs. ex situ	-3.35 ± 1.04	7.90	10.39	0.012	3.09	
Self-righting (sec)						
Intercept	0.94 ± 0.20			0.003		0.26
in situ vs. ex situ	1.14 ± 0.31	7.42	13.99	0.007	-6.16	

cAIC, conditional Akaike information criteria; $\beta \pm SE$, regression coefficient \pm standard error; d.f., degrees of freedom calculated by Welch-Satterthwaite equation; F, F ratio; p, p-value; ES, effect size calculated by Glass's Δ ; R², marginal coefficient of determination.

medial and dorsomedial cortices of hatchlings from *ex situ* clutches could reflect deficient prenatal cell proliferation or precursor migration. The difference between *in situ* and *ex situ* conditions for NeuN + cells was higher in the medial cortex, suggesting differential cortical sensitivity to early non-optimal conditions, as observed in mammals (Alkadhi, 2019). These findings, together with our prior work in male hatchlings (Herrera-Vargas et al., 2017), suggest that *ex situ* incubation alters neurogenic events during critical prenatal and early postnatal windows. The functional relevance of our findings for sea turtle cognitive and behavioral performance in the short and long-term are still unknown. However, recent evidence in lizards supports prior studies in mammals and birds, showing that a disturbance in neurogenesis during development could impair spatial memory and migration either during early life or adulthood (Amiel et al., 2017; Dayananda and Webb, 2017). Interestingly, these studies have related non-optimal incubation temperatures with decreased hippocampal neurogenesis in lizards (Amiel et al., 2017; Dayananda and Webb, 2017). Herein, nest temperature, moisture, and substrate composition differentiate *in situ* vs. *ex situ* nests; however, neither isolated abiotic variable was directly associated to altered neurogenesis in hatchling turtles. Follow-up studies should experimentally assess the effect of either variable separately or as a whole on hippocampal cell proliferation and neuronal integration early during ontogenesis in sea turtles.

Brain development begins at stage III (incubation day 4) in *Caretta caretta* turtles (García-Cerdá and López-Jurado, 2009). Thus, early relocation to hatcheries is not likely to account for the observed developmental alterations. However, future studies should be done to rule-out this possibility.

Ex situ Incubation Is Associated With a Lower Ovarian Cell Proliferation in *Lepidochelys olivacea* Hatchlings

The *ex situ* incubation strategy was associated with a dramatic reduction of ovarian cell proliferation in turtle hatchlings at nest emergence, evidenced by few BrdU + cells. In *L. olivacea*, gonadal development starts in the middle third of incubation (day 16 of development), when primordial germ cells accumulate at the base of gonadal ridge (Merchant-Larios et al., 1997). In this species, warm temperatures (32–33°C) promote ovary formation by stimulating the production of estradiol and aromatase from the undifferentiated gonad and adjacent tissues: the mesonephros and inter-renal glands (Wibbels et al., 1991, 1993; Ewert et al., 2004; Freedberg et al., 2006; Díaz-Hernández et al., 2015, 2017). The highest peak of ovarian cell proliferation is not known for *L. olivacea* hatchlings. However, folliculogenesis and oocyte entry into meiosis occur in the 3rd–5th post-hatching months (Merchant-Larios et al., 1989), suggesting that this peak occurs perinatally. The consequences of reduced germ

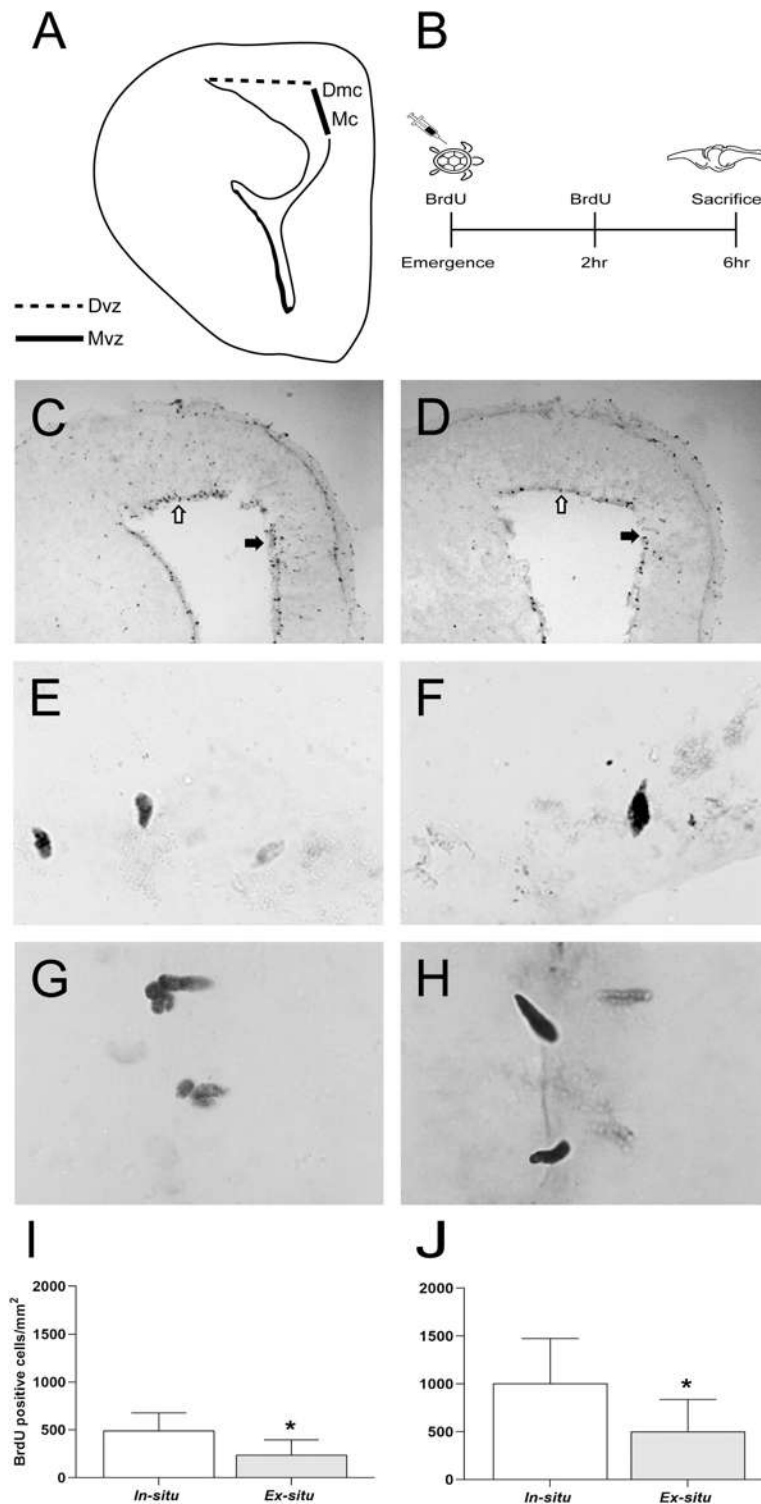


FIGURE 3 | Cell proliferation in neurogenic niches of *L. olivacea* hatchlings. **(A)** Schematic drawing of turtle brain hemi-section showing the dorsal (Dvz, dotted line) and medial ventricular zone (Mvz, continuous dark line), lining the lateral ventricle. **(B)** Timeline for 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) pulse-chase protocol for cell proliferation analysis. **(C,D)** Representative brain sections showing BrdU + nuclei in the Dvz (open arrow) and Mvz (filled arrow) of one turtle from each condition (*in situ* and *ex situ*, respectively). **(E,F)** Representative high magnification photographs showing BrdU + nuclei in the Dvz of one turtle from each condition (*in situ* and *ex situ*, respectively). **(G,H)** Representative high magnification photographs showing BrdU + nuclei in the Mvz of one turtle from each condition (*in situ* and *ex situ*, respectively). **(I,J)** Graphs showing the density of BrdU + nuclei. *In situ* ($n = 5$), *ex situ* ($n = 5$). Mean \pm SD, Type III Analysis of Variance $*p \leq 0.05$, scale bar = 200 μm for panels **(C,D)** and 50 μm for panels **(E-H)**.

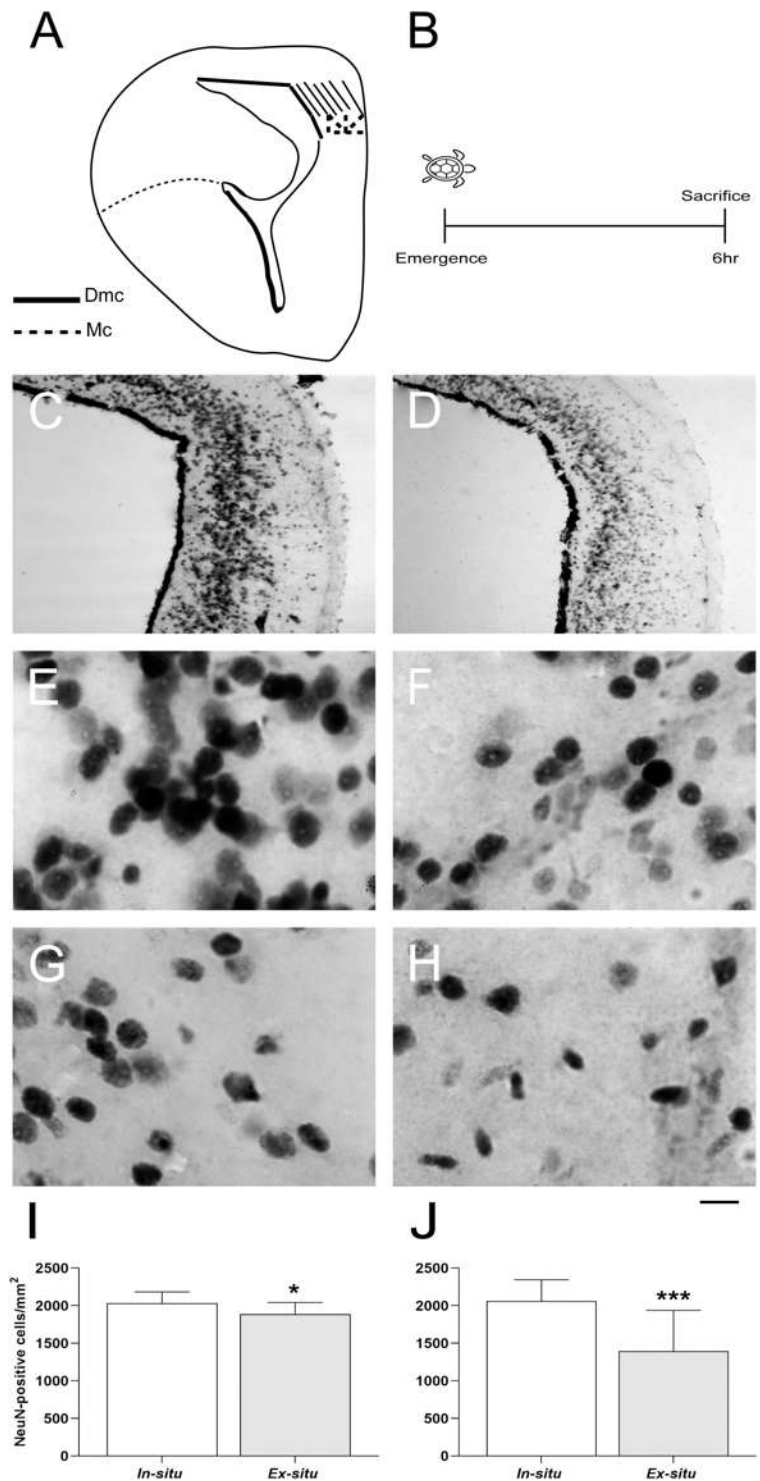


FIGURE 4 | Neuronal integration in brain areas homologous to the mammalian hippocampus in *L. olivacea* hatchlings. **(A)** Schematic drawing of turtle brain hemi-section showing the dorsomedial (Dmc, stripes) and medial (Mc, stippled) cortices. **(B)** Timeline for neuronal integration analysis. **(C,D)** Representative brain sections showing neuronal nuclear protein (NeuN) in the Dmc and Mc of one turtle from each condition (*in situ* and *ex situ*, respectively). **(E,F)** Representative high magnification photographs showing NeuN + nuclei in the Dmc of one turtle from each condition (*in situ* and *ex situ*, respectively). **(G,H)** Representative high magnification photographs showing NeuN + nuclei in the Mc of one turtle from each condition (*in situ* or *ex situ*, respectively). **(I,J)** Graphs showing the density of NeuN + nuclei. *In situ* (n = 5), *ex situ* (n = 5). Mean ± SD, Type III Analysis of Variance **p* ≤ 0.05, ****p* ≤ 0.001, scale bar = 200 μm for panels **(C,D)** and 50 μm for panels **(E-H)**.

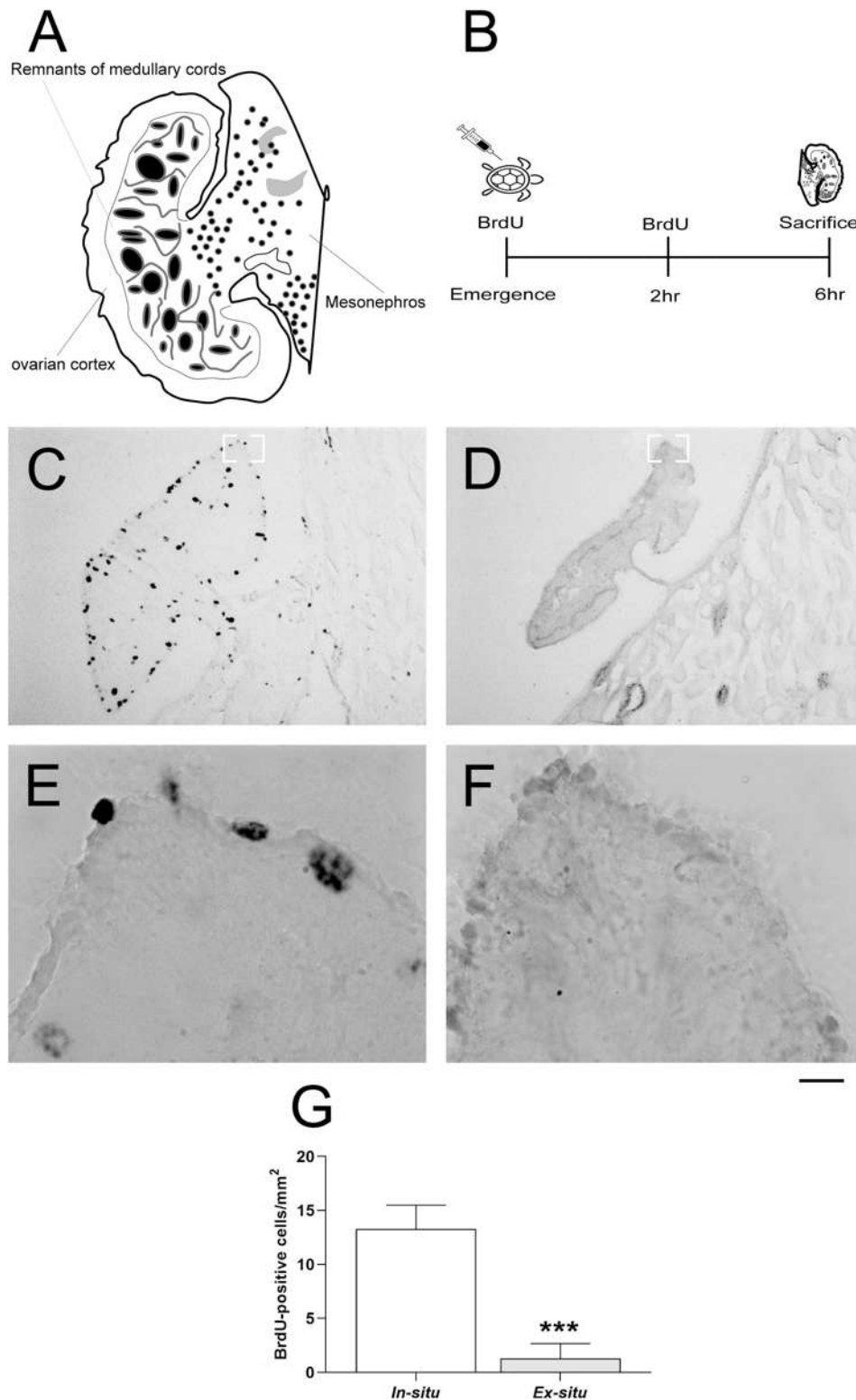
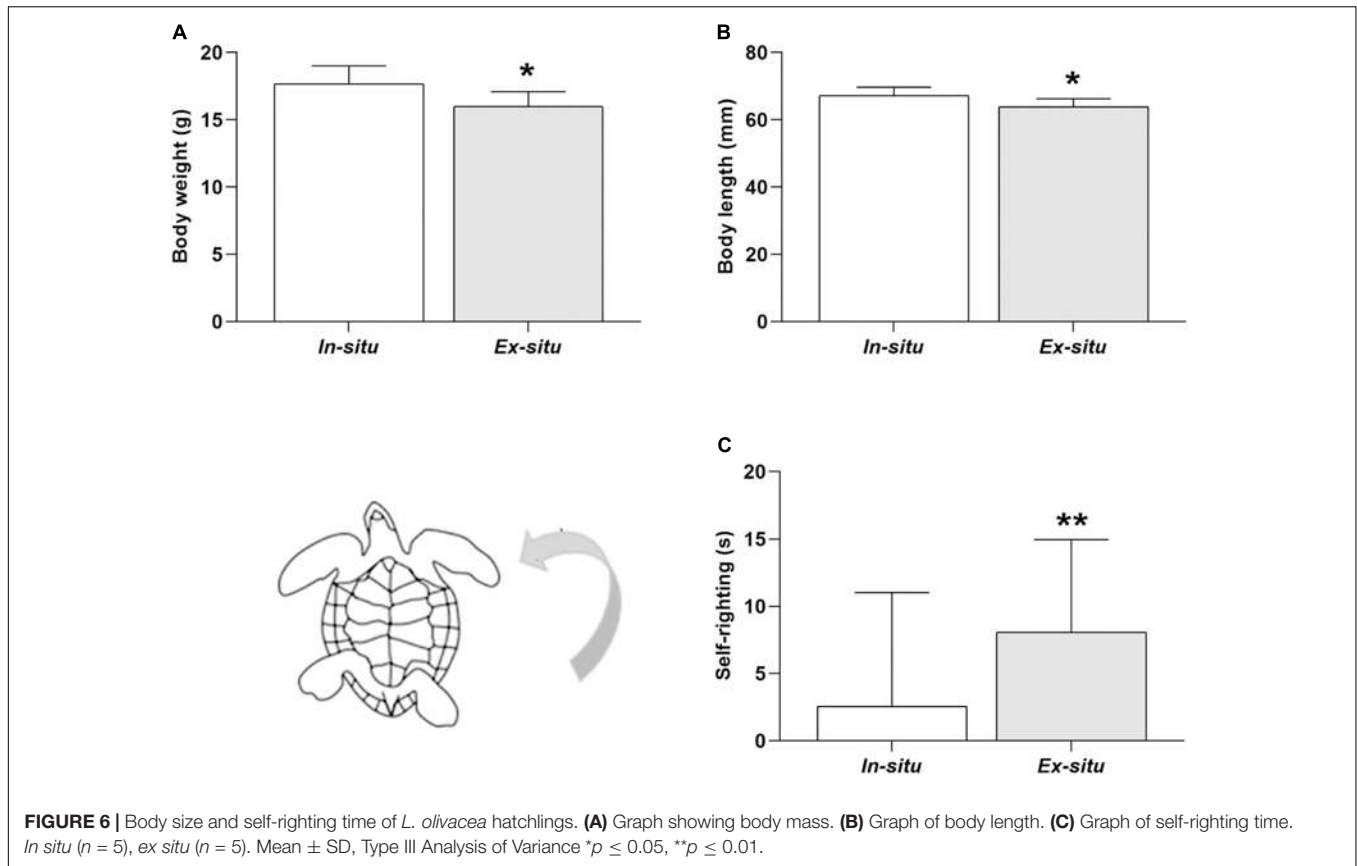


FIGURE 5 | Ovarian cell proliferation in *L. olivacea* females. **(A)** Schematic drawing of the turtle gonad-mesonephros complex. **(B)** Timeline for ovarian cell proliferation analysis. **(C, D)** Representative ovarian sections showing 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) + nuclei in one turtle from each condition (*in situ* and *ex situ*, respectively). **(E, F)** Representative high magnification photographs showing BrdU + nuclei in the ovarian cortex of one turtle from each condition (*in situ* and *ex situ*, respectively). **(G)** Graph showing the density of ovarian BrdU + nuclei. *In situ* ($n = 5$), *ex situ* ($n = 5$). Mean \pm SD, Type III Analysis of Variance $***p \leq 0.001$, scale bar = 200 μm for panels **(C, D)** and 50 μm for panels **(E, F)**.



cell proliferation in female juvenile or adult turtles have not been evaluated. In rodents, germ cell absence does not allow ovarian follicle development (McLaren et al., 1984) or results in follicle degeneration (Ray and Potu, 2010; Bishop et al., 2019). In mammals, reduced cell proliferation may result in delayed ovarian formation or even complete infertility (Monniaux, 2018).

In this study, ovarian weight was not formally evaluated, since each was dissected together with the mesonephros. Interestingly, qualitative histological observations of ovarian sections did not obviously evidence a reduction in cell density. Herein, the main variable explaining the diminished ovarian cell proliferation was the *ex situ* condition, which probably included the effect of incubation temperature plus moisture and substrate composition. Future studies are needed to identify the effects of *ex situ* incubation on ovarian cell density, evaluate the contribution of each abiotic variable on the ovarian phenotype and elucidate the long-term effects of poorly developed ovaries.

Ex situ Incubation Is Related to a Lower Body Size and Motor Performance at Nest Emergence

Hatchlings from *ex situ* clutches showed a lower body mass and straight carapace length than those from *in situ* nests. Linear mixed models for body mass and length suggested that the nest condition (*in situ* vs. *ex situ*) was an important factor influencing them. A direct contribution of isolated abiotic variables could

not be identified. However, it is known that temperature plays a chief role determining reptile body size (Stewart et al., 2019). Although sand temperatures were above the threshold to promote female differentiation in both conditions, they likely differentially affected hatchling body size, as previously suggested (Robledo-Avila et al., 2022). Mean sand temperatures registered for *in situ* clutches were approximately 1°C below those in *ex situ* clutches, whereas mean maximum temperatures registered for both conditions showed broader ranges (35.68°C \pm 0.83 SD for *in situ* nests and 37.03°C \pm 1.29 SD for *ex situ* nests). Accordingly, the incubation duration was shorter by one day for *ex situ* clutches.

The mechanisms that may account for a differential temperature effect on the growth rate include a direct action on cell, tissue, or organ differentiation, as well as long-term neuroendocrine changes possibly *via* epigenetic alterations (Singh et al., 2020). Additionally, it is recognized that moisture also plays a role on body size, although the mechanisms are less well known. Modifications to gas exchange could explain the effects of moisture on development (Wallace et al., 2004). Other variables, such as nesting female size (Chatting et al., 2018), egg mass (Wallace et al., 2006), metabolic expenditure (Rusli et al., 2016; Gammon et al., 2020), or yolk absorption (Stand, 2002) also may contribute to determining body size in reptiles. A study showed an interaction between the maternal component, sand temperature, moisture, and body length in the loggerhead sea turtles. Moreover, it described differential effects

of moisture on body length throughout development (i.e., a more prominent role of nest moisture on body mass during the last third of development; Tezak et al., 2020). Thus, the combined contribution of several abiotic and biotic variables could explain our results, as discussed below.

A larger body size has been consistently related with better motor performance and thus with better survival chances (Fleming et al., 2020; Martins et al., 2020). In this study, principal component 1 showed a negative relationship between body mass and length with self-righting ability, supporting prior observations. Moreover, self-righting has been associated with incubatory conditions like temperature and substrate composition, therefore constituting a good indicator of microenvironmental conditions (Stewart et al., 2019; Reboul et al., 2021). Herein, nest silt and temperature were related to increased turning time of hatchlings, in accordance with prior studies (Stewart et al., 2019; Reboul et al., 2021).

Impact of Abiotic Variables on Developmental Responses

Several nest-related abiotic variables were measured to determine their potential contribution to the observed developmental effects in *L. olivacea* hatchlings. The results showed that *in situ* clutch conditions were related to a better turtle phenotype (i.e., greater body size, higher neurogenesis, increased ovariogenesis, and lesser time to self-righting). *In situ* nests showed lower temperatures, were located higher on the beach and in coarse sand with lower silt levels, while *ex situ* clutches showed the opposite. Accordingly, sand composition, temperature, and moisture were important for differences between *in situ* and *ex situ* clutches. However, a differential contribution of each abiotic variable, in isolation, to the developmental traits could not be identified. One possible explanation is that emergent properties of microenvironment-associated abiotic variables affect the turtle hatchling development. Recent reports support this idea (Tezak et al., 2020; Tanabe et al., 2021).

Interestingly, although *in situ* nests showed lower temperatures than *ex situ* nests, the average temperatures for the incubation period, as well the mean maximum temperatures for both conditions were above the thermal tolerance reported for *L. olivacea* embryos (Valverde et al., 2010; Maulany et al., 2012). Temperature is a chief parameter that determines brain, gonadal and motor system development (Reece et al., 2002; Amiel and Shine, 2012; Paredes et al., 2016; Amiel et al., 2017; Fleming et al., 2020), as well embryo survival inside the nest (Robledo-Avila et al., 2022). Thus, it likely also plays a major role in explaining the observed phenotypes. However, its direct contribution could not be determined.

Ex situ clutches showed a higher silt proportion, which was negatively associated with hatchling development. Previous studies have shown that successful embryo development occurs in sandy substrates (grain diameter: 0.063–2 mm), whereas substrates with a high silt content (grain size < 0.063) cause mortality and diminished egg weight, reduced hatchling mass and size, as well as lower fitness (Sarmiento-Ramírez et al.,

2014; Marco et al., 2017). The proportion of silt observed in both incubation conditions was below the value described as detrimental for embryo development (0.02; Abella-Pérez, 2011). Thus, although its effects on neurogenesis, ovariogenesis, body size, and motor abilities should not be ruled out, silt is unlikely to completely explain the observed phenotypes. The proportion of silt may affect moisture, gas exchange and/or microbial load (Marco et al., 2017).

Alternatively, the scarce contribution of sediment size, temperature, and moisture to completely explain the observed phenotypes could result from procedural details. Sand temperature was recorded before the thermosensitive period began (developmental day 11), until turtle emergence to avoid disturbing egg development. This interval includes the peak of hippocampal neurogenesis and the critical window for sex determination. Surface sand (10 cm deep) was sampled for moisture and particle size measurements right after turtles emerged. Future studies should record the temperature inside the nest during the entire incubation period and collect sand surrounding the eggs. This should verify the microenvironmental contribution to the effects of clutch relocation on development of sea turtle hatchlings. Moreover, future experiments should measure temperature inside the nest to consider the effect of metabolic heating on the observed phenotypes.

It must be noted that the *ex situ* incubation strategy, *per se* likely did not directly affect hatchling development. However, the combined effect of the incubation microenvironment was probably directly to blame for the phenotypic effects. This idea is supported by our prior study on the action of *ex situ* nests on the configuration of the immune system (Robledo-Avila et al., 2022).

Besides the measured abiotic factors, other variables such as micro-biological parameters (Patino-Martínez et al., 2012) may explain the developmental changes. Recent split-clutch designs have highlighted the maternal contribution to hatchling body size and self-righting response (Kobayashi et al., 2020; Tezak et al., 2020). This study did not consider the maternal component to privilege normal conditions (i.e., leaving natural nests undisturbed). However, parental origin, egg movement, and reburial should be studied to identify the factors that determine the altered phenotypes. These studies will result in recommendations for hatchery management to maximize the developmental potential of sea turtles.

CONCLUSION

Ex situ protection in hatcheries is undoubtedly the only choice if *in situ* incubation is not viable. However, our results suggest that this strategy can be associated with negative effects on sea turtle phenotypes. This include reduced neurogenesis, ovariogenesis, and motor performance during critical windows of development. Our results suggest a synergic effect of environmental variables on the observed phenotypes, but it was not possible to identify a differential contribution of each factor alone. More research should be done on the impact of *ex situ* incubation on cognitive,

behavioral, and reproductive performance of juvenile or adult sea turtles experimentally manipulating abiotic variables.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SGPA/DGVS/10395/17.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NU-D and CA: methodology and investigation. BP-F: formal analysis, writing – original draft, review, and editing. HN: formal analysis and writing – review and editing. LL-T and CM: methodology and formal analysis. NL and LT: visualization and supervision. MH-V: methodology. AF-F: conceptualization and funding acquisition. EM-H: conceptualization, data curation,

writing – original draft, review, and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT no. 258747 to AF-F) and the Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH to EM-H and AF-F. NU-D was Ph.D. fellow from CONACyT (grant number 256790).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. C. José Alejandro Marmolejo Valencia, Biol. Edel Pineda López, and Biol. Fidel Anguiano Rodríguez for their valuable technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2022.850612/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abella-Pérez, E. (2011). Environmental and management factors affecting embryonic development in the loggerhead turtle *Caretta caretta* (L., 1758): implications for controlled egg incubation programmes. *Zool. Caboverdiana* 2, 40–42.
- Ackerman, R. A. (1977). The respiratory gas exchange of sea turtle nests (*Chelonia*, *Caretta*). *Respir. Physiol.* 31, 19–38. doi: 10.1016/0034-5687(77)90062-7
- 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
- Alkadhi, K. A. (2019). Cellular and Molecular Differences Between Area CA1 and the Dentate Gyrus of the Hippocampus. *Mol. Neurobiol.* 56, 6566–6580. doi: 10.1007/s12035-019-1541-2
- Altman, J., and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335. doi: 10.1002/cne.901240303
- Amiel, J. J., Bao, S., and Shine, R. (2017). The effects of incubation temperature on the development of the cortical forebrain in a lizard. *Anim. Cogn.* 20, 117–125. doi: 10.1007/s10071-016-0993-2
- Amiel, J. J., and Shine, R. (2012). Hotter nests produce smarter young lizards. *Biol. Lett.* 8, 372–374. doi: 10.1098/rsbl.2011.1161
- Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Rawlins, J. N., Monyer, H., et al. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 181–192. doi: 10.1038/nrn3677
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01
- Bayer, S., and Altman, J. (2004). “Development of the telencephalon: neural stem cells, neurogenesis and neuronal migration,” in *The Rat Nervous System*, ed. G. Paxinos (London: Academic Press), 27–73.
- Beltrán, I., Herculano-Houzel, S., Sinervo, B., and Whiting, M. J. (2021). Are ectotherm brains vulnerable to global warming? *Trends Ecol. Evol.* 36, 691–699. doi: 10.1016/j.tree.2021.04.009
- Bishop, C. V., Reiter, T. E., Erikson, D. W., Hanna, C. B., Daughtry, B. L., Chavez, S. L., et al. (2019). Chronically elevated androgen and/or consumption of a Western-style diet impairs oocyte quality and granulosa cell function in the nonhuman primate periovulatory follicle. *J. Assist. Reprod. Genet.* 36, 1497–1511. doi: 10.1007/s10815-019-01497-8
- Blanck, C. E., and Sawyer, R. H. (1981). Hatchery practices in relation to early embryology of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta* (Linné). *J. Exp. Mar. Biol. Eco.* 49, 163–177. doi: 10.1016/0022-0981(81)90068-X
- Booth, D., and Astill, K. (2001a). Incubation temperature, energy expenditure and hatchling size in the green turtle (*Chelonia mydas*), a species with temperature-sensitive sex determination. *Aust. J. Zool.* 49, 389–396. doi: 10.1071/ZO01006
- Booth, D., and Astill, K. (2001b). 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
- Booth, D. T., Feeney, R., and Shibata, Y. (2013). Nest and maternal origin can influence morphology and locomotor performance of hatchling green turtles (*Chelonia mydas*) incubated in field nests. *Mar. Biol.* 160, 127–137. doi: 10.1007/s00227-012-2070-y
- Brady, N., and Weil, R. (2008). *The Nature and Properties of Soils*, 14th Edn. Hoboken, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Butler, A. B., and Hodos, W. (2005). “Overview of the Forebrain,” in *Comparative Vertebrate Neuroanatomy*, Second Edn, eds A. B. Butler and W. Hodos (Hoboken, NJ: Wiley), 341–372. doi: 10.1002/0471733849.ch19
- Chatting, M., Smyth, D., Al-Maslami, I., Obbard, J., Al-Ansi, M., Hamza, S., et al. (2018). Nesting ecology of hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, in an extreme environmental setting. *PLoS One* 13:e0203257. doi: 10.1371/journal.pone.0203257
- Chen, S. R., and Liu, Y. X. (2016). Testis cord maintenance in mouse embryos: genes and signaling. *Biol. Reprod.* 94:42. doi: 10.1095/biolreprod.115.13.7117
- Coomer, P., Crews, D., and Gonzalez-Lima, F. (1997). Independent effects of incubation temperature and gonadal sex on the volume and metabolic capacity of brain nuclei in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), a lizard with temperature-dependent sex determination. *J. Comp. Neurol.* 380, 409–421. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19970414)380:3<409:aid-cne9<3.0.co;2-6
- Cowan, C. S. M., and Richardson, R. (2018). A brief guide to studying fear in developing rodents: important Considerations and Common Pitfalls. *Curr. Protoc. Neurosci.* 83:e44. doi: 10.1002/cpns.44

- Dang, W., Zhang, W., and Du, W. G. (2015). Incubation temperature affects the immune function of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *Sci. Rep.* 5:10594. doi: 10.1038/srep10594
- Dayananda, B., and Webb, J. K. (2017). Incubation under climate warming affects learning ability and survival in hatchling lizards. *Biol. Lett.* 13:20170002. doi: 10.1098/rsbl.2017.0002
- de Melo, S. R., de David, Antoniazzi, C. T., Hossain, S., and Kolb, B. (2018). Neonatal stress has a long-lasting sex-dependent effect on anxiety-like behavior and neuronal morphology in the prefrontal cortex and hippocampus. *Dev. Neurosci.* 40, 93–103. doi: 10.1159/000486619
- Deng, W., Aimone, J. B., and Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339–350. doi: 10.1038/nrn2822
- Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A., and Merchant-Larios, H. (2015). Exogenous estradiol alters gonadal growth and timing of temperature sex determination in gonads of sea turtle. *Dev. Biol.* 408, 79–89. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.05.022
- Díaz-Hernández, V., Vázquez-Gómez, A., Marmolejo-Valencia, A., Montaña, L. M., and Merchant-Larios, H. (2017). 17 β -Estradiol modulates cell proliferation of medullary cords during ovarian differentiation of the *Lepidochelys olivacea* sea turtle. *Dev. Biol.* 431, 263–271. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.008
- Dimatelis, J. J., Vermeulen, I. M., Bugarith, K., Stein, D. J., and Russell, V. A. (2015). Female rats are resistant to developing the depressive phenotype induced by maternal separation stress. *Metab. Brain. Dis.* 31, 109–119. doi: 10.1007/s11011-015-9723-8
- 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
- Ewert, M. A., Etchberger, C., and Nelson, C. E. (2004). “Turtle Sex-Determining Modes and TSD Patterns, and Some TSD Pattern Correlates,” in *Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates*, eds N. Valenzuela and V. Lance (Washington, D.C: Smithsonian Institution Press), 21–32.
- Fleming, K. A., Perrault, J. R., Stacy, N. I., Coppenrath, C. M., and Gainsbury, A. M. (2020). Heat, health and hatchlings: associations of in situ nest temperatures with morphological and physiological characteristics of loggerhead sea turtle hatchlings from Florida. *Conserv. Physiol.* 8:coaa046. doi: 10.1093/conphys/coaa046
- Freedberg, S., Greives, T. J., Ewert, M. A., Demas, G. E., Beecher, N., and Nelson, C. E. (2008). Incubation environment affects immune system development in a turtle with environmental sex determination. *J. Herpetol.* 42, 536–541. doi: 10.1670/07-133.1
- Freedberg, S., Nelson, C. E., and Ewert, M. A. (2006). Estradiol-17 β induces lasting sex reversal at male-producing temperatures in kinosternid turtles. *J. Herpetol.* 40, 95–98.
- Gage, F. H. (2002). Neurogenesis in the adult brain. *J. Neurosci.* 22, 612–613. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00612.2002
- Gammon, M., Fossette, S., McGrath, G., and Mitchell, N. (2020). A systematic review of metabolic heat in sea turtle nests and methods to model its impact on hatching success. *Front. Ecol. Evol.* 8:556379. doi: 10.3389/fevo.2020.556379
- García-Cerdá, M. R., and López-Jurado, L. F. (2009). *Desarrollo Embrionario de Caretta: Análisis Descriptivo de su Evolución Morfológica*. Ph.D. thesis. Las Palmas: Departamento de Biología Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Ge, C., Ye, J., Weber, C., Sun, W., Zhang, H., Zhou, Y., et al. (2018). The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species. *Science* 360, 645–648. doi: 10.1126/science.aap8328
- Gee, G. W., and Or, D. (2002). “Particle-size analysis,” in *Methods of soil analysis*, *Soil Science Society of America*, eds J. H. Dane and G. C. Topp (Madison, WI: Soils Science Society of America), 255–293. doi: 10.2136/sssabookser5.4.c12
- Goffinet, A. M., Daumerie, C., Langerwerf, B., and Pieau, C. (1986). Neurogenesis in reptilian cortical structures: ³H-Thymidine autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol.* 243, 106–116. doi: 10.1002/cne.902430109
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., and Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* 2, 260–265. doi: 10.1038/6365
- Harrison, X. A., Donaldson, L., Correa-Cano, M. E., Evans, J., Fisher, D. N., Goodwin, C. E. D., et al. (2018). A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ* 6:e4794. doi: 10.7717/peerj.4794
- Head, K. H. (1992). *Manual of Soil Laboratory Testing*. New York, NY: Halsted Press.
- Heim, C., and Nemeroff, C. B. (2002). Neurobiology of early life stress: clinical studies. *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 7, 147–159. doi: 10.1053/scnp.2002.33127
- Heppell, S. S., Burchfield, P. M., and Peña, L. J. (2007). “Kemp’s ridley recovery. How far have we come, and where are we headed?,” in *Biology and Conservation of Ridley Sea Turtles*, ed. P. T. Plotkin (Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press), 325–335.
- Heppell, S. S., Crouse, D. T., Crowder, L. B., Epperly, S. P., Gabriel, W., Henwood, T., et al. (2005). A population model to estimate recovery time, population size, and management impacts on Kemp’s ridley sea turtles. *Chelonian Conserv. Biol.* 4, 767–773.
- Herrera-Vargas, A., Meléndez-Herrera, E., Gutiérrez-Ospina, G., Bucio-Piña, F. B., Báez-Saldaña, A., Siliceo-Cantero, H., et 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
- Holm, J. B., Mazaud-Guittot, S., Danneskiold-Samsøe, N. B., Chalmey, C., Jensen, B., Norregård, M. M., et al. (2016). Intrauterine exposure to paracetamol and aniline impairs female reproductive development by reducing follicle reserves and fertility. *Toxicol. Sci.* 150, 178–189. doi: 10.1093/toxsci/kfv332
- IUCN (2020). *The IUCN Red List of Threatened Species*. Gland: IUCN.
- Kobayashi, S., Endo, D., Kondo, S., Kitayama, C., Ogawa, R., Arai, K., et al. (2020). Investigating the effects of nest shading on the green turtle (*Chelonia mydas*) hatchling phenotype in the Ogasawara islands using a field-based split clutch experiment. *J. Exp. Zool. A Ecol. Integr. Physiol.* 2020, 629–636. doi: 10.1002/jez.2411
- Kuhn, H. G., Eisch, A. J., Spalding, K., and Peterson, D. A. (2016). Detection and phenotypic characterization of adult neurogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a025981. doi: 10.1101/cshperspect.a025981
- Kutzari (2006). *Manual de Técnicas de Protección de Tortugas Marinas*. Available online at: https://savepacificleatherbacks.org/wp-content/uploads/2017/08/KUTZARI-MANUAL_TORTUGAS.pdf (accessed Dec. 28, 2020).
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., and Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *J. Stat. Softw.* 82, 1–26. doi: 10.18637/jss.v082.i13
- Lajud, N., and Torner, L. (2015). Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Front. Mol. Neurosci.* 8, doi: 10.3389/fnmol.2015.00003
- Limpus, C., Baker, V., and Miller, J. (1979). Movement induced mortality of loggerhead eggs. *Herpetologica* 35, 335–338.
- Lolavar, A., and Wynneken, J. (2020). The impact of sand moisture on the temperature-sex ratio responses of developing loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles. *Zoology* 138:125739. doi: 10.1016/j.zool.2019.125739
- Lüdtke, D., Ben-Shachar, M. S., Patil, I., Waggoner, P., and Makowski, D. (2021). performance: an R package for assessment, comparison and testing of statistical models. *J. Open Sour. Softw.* 6:3139. doi: 10.21105/joss.03139
- Lutcavage, M. E., Plotkin, P., Witherington, B., and Lutz, P. (1997). “Human impacts on sea turtle survival,” in *The biology of Sea Turtles*, eds P. L. Lutz and J. A. Musick (Boca Raton, FL: CRC Press), 387–409.
- Marco, A., Abella-Perez, E., and Tiwari, M. (2017). Vulnerability of loggerhead turtle eggs to the presence of clay and silt on nesting beaches. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 486, 195–203. doi: 10.1016/j.jembe.2016.10.015
- Martins, S., Silva, E., Abella, E., de Santos Loureiro, N., and Marco, A. (2020). Warmer incubation temperature influences sea turtle survival and nullifies the benefit of a female-biased sex ratio. *Clim. change* 163, 689–704.
- 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
- Mazaris, A. D., Schofield, G., Gkazinou, C., Almpandou, V., and Hays, G. C. (2017). Global sea turtle conservation successes. *Sci. Adv.* 3:e1600730. doi: 10.1126/sciadv.1600730

- McDonald, R. P., and Vickaryous, M. K. (2018). Evidence for neurogenesis in the medial cortex of the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Sci. Rep.* 8:9648. doi: 10.1038/s41598-018-27880-6
- 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, B. S. (2012). Brain on stress: How the social environment gets under the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17180–17185. doi: 10.1073/pnas.1121254109
- McLaren, A., Simpson, E., Tomonari, K., Chandler, P., and Hogg, H. (1984). Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312, 552–555. doi: 10.1038/312552a0
- Medina, L., Abellán, A., and Desfilis, E. (2017). Contribution of genoarchitecture to understanding hippocampal evolution and development. *Brain Behav. Evol.* 90, 25–40. doi: 10.1159/000477558
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramirez, S., Moreno-Mendoza, N., and Marmolejo-Valencia, A. (1997). Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107, 373–385. doi: 10.1006/gcen.1997.6946
- Merchant-Larios, H., Villalpando-Fierro, I., and Centeno-Urruiza, B. (1989). Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetol. Monogr.* 3, 43–61. doi: 10.2307/1466985
- Miller, J. D. (1985). "Embryology of marine turtles," in *Biology of the Reptilia Vol. 14A Development*, eds C. Gans, F. Billett, and P. F. A. Maderson (New York, NY: Wiley-Interscience), 269–328.
- Mitchell, T. S., and Janzen, F. J. (2019). Substrate influences turtle nest temperature, incubation period, and offspring sex ratio in the field. *Herpetologica* 75, 57–62. doi: 10.1655/D-18-00001
- Monniaux, D. (2018). Factors influencing establishment of the ovarian reserve and their effects on fertility. *Anim. Reprod.* 15, 635–647. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0011
- NOM-162-SEMARNAT (2012). *Que establece las especificaciones para la protección, recuperación y manejo de las poblaciones de las tortugas marinas en su hábitat de nidación*. Available online at: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5286506&fecha=01/02/2013 (accessed December 28, 2020).
- NOM-033-SAG/ZOO (2014). *Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres*. Available online at: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015 (accessed December 28, 2020).
- Paredes, U., Radersma, R., Cannell, N., While, G. M., and Uller, T. (2016). Low incubation temperature induces DNA hypomethylation in lizard brains. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 325, 390–395. doi: 10.1002/jez.2024
- Patino-Martinez, J., Marco, A., Quiñones, 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 leatherback turtle eggs. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 317, 47–54. doi: 10.1002/jez.719
- Pintus, K. J., Godley, B. J., McGowan, A., and Broderick, A. C. (2009). Impact of clutch relocation on green turtle offspring. *J. Wild. Manage.* 73, 1151–1157. doi: 10.2193/2008-103
- R Core Team (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing*. Available online at: <https://www.R-project.org/> (accessed Dec. 28, 2020).
- Ray, B., and Potu, B. K. (2010). Ovarian folliculogenesis: detrimental effect of prenatal exposure to cyclophosphamide: a preliminary study. *Bratisl. Lek. Listy* 111, 369–372.
- Reboul, I., Booth, D., and Rusli, U. (2021). Artificial and natural shade: implications for green turtle (*Chelonia mydas*) rookery management. *Ocean Coast. Manag.* 204:105521.
- Reece, S. E., Broderick, A. C., Godley, B. J., and West, S. A. (2002). The effects of incubation environment, sex and pedigree on hatchling phenotype in a natural population of loggerhead sea turtles. *Evol. Ecol. Res.* 4, 737–748.
- Robledo-Avila, L. A., Phillips-Farfán, B. V., Harfush, M., López, L., Tafolla, D., Herrera-Vargas, M. A., et al. (2022). Ex-situ conservation in hatcheries is associated with spleen development in *Lepidochelys olivacea* turtle hatchlings. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 265:111130. doi: 10.1016/j.cbpa.2021.111130
- Rusli, M. U., Stand, D. T., and Joseph, J. (2016). Synchronous activity lowers the energetic cost of nest escape for sea turtle hatchlings. *J. Exp. Biol.* 10, 1505–1513. doi: 10.1242/jeb.134742
- RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. Boston, MA: RStudio, PBC.
- Säefken, B., Rügamer, D., Kneib, T., and Greven, S. (2018). Conditional model selection in mixed-effects models with *aIC4*. *ArXiv [Preprint]*. doi: 10.48550/arXiv.1803.05664
- Sanger, T. J., Harding, L., Kyrkos, J., Turnquist, A. J., Epperlein, L., Nunez, S. A., et al. (2021). Environmental thermal stress induces neuronal cell death and developmental malformations in reptiles. *Integr. Org. Biol.* 3:obab033. doi: 10.1093/iob/obab033
- Sanger, T. J., Kyrkos, J., Lachance, D. J., Czesny, B., and Stroud, J. T. (2018). The effects of thermal stress on the early development of the lizard *Anolis sagrei*. *J. Exp. Zool. A Ecol. Integr. Physiol.* 329, 244–251. doi: 10.1002/jez.2185
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., and McEwen, B. S. (1984). Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6174–6177. doi: 10.1073/pnas.81.19.6174
- Sapolsky, R. M., McEwen, B. S., and Rainbow, T. C. (1983). Quantitative autoradiography of [³H] corticosterone receptors in rat brain. *Brain Res.* 271, 331–334. doi: 10.1016/0006-8993(83)90295-0
- Sarmiento-Martínez, J. M., Abella-Pérez, E., Phillott, A. D., Sim, J., van West, P., Martín, M. P., et al. (2014). Global distribution of two fungal pathogens threatening endangered sea turtles. *PLoS One* 9:e85853. doi: 10.1371/journal.pone.0085853
- Sieg, A. E., Binkley, C. A., Wallace, B. P., Tomillo, P. S., Reina, R. D., Paladino, F. V., et al. (2011). Sex ratios of leatherback turtles: hatchery translocation decreases metabolic heating and female bias. *Endanger. Species Res.* 15, 195–204.
- Singh, S. K., Das, D., and Rhen, T. (2020). Embryonic temperature programs phenotype in reptiles. *Front. Physiol.* 11:35. doi: 10.3389/fphys.2020.00035
- Sink, C. A., and Mvududu, N. H. (2010). Statistical power, sampling, and effect sizes: three keys to research relevancy. *Couns. Outcome Res. Evaluat.* 1, 1–18. doi: 10.1177/2150137810373613
- Sönmez, B., Turan, C., and Yalçın Özdilek, S. (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.
- Stand, D. T. (2002). Incubation of rigid-shelled turtle eggs: do hydric conditions matter? *J. Comp. Physiol. B* 172, 627–633. doi: 10.1007/s00360-002-0291-y
- Stewart, T. A., Booth, D. T., and Rusli, M. U. (2019). Influence of sand grain size and nest microenvironment on incubation success, hatchling morphology and locomotion performance of green turtles (*Chelonia mydas*) at the Chagar Hutang Turtle Sanctuary, Redang Island, Malaysia. *Aust. J. Zool.* 66, 356–368. doi: 10.1071/ZO19025
- Suh, J., Rivest, A. J., Nakashiba, T., Tominaga, T., and Tonegawa, S. (2011). Entorhinal cortex layer III input to the hippocampus is crucial for temporal association memory. *Science* 334, 1415–1420. doi: 10.1126/science.1210125
- Sullivan, G. M., and Feinn, R. (2012). Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *J. Grad. Med. Educ.* 4, 279–282. doi: 10.4300/JGME-D-12-00156.1
- Tanabe, L. K., Ellis, J., Elsadek, I., and Berumen, M. L. (2020). Potential feminization of Red Sea turtle hatchlings as indicated by in situ sand temperature profiles. *Conserv. Sci. Pract.* 2:e266. doi: 10.1111/csp.2.266
- Tanabe, L. K., Steenacker, M., Rusli, M. U., and Berumen, M. L. (2021). Implications of nest relocation for morphology and locomotor performance of green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings. *Ocean Coast. Manag.* 207:105591. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2021.105591
- Telemeco, R. S., Warner, D. A., Reida, M. K., and Janzen, F. J. (2013). Extreme developmental temperatures result in morphological abnormalities in painted turtles (*Chrysemys picta*): a climate change perspective. *Integr. Zool.* 8, 197–208. doi: 10.1111/1749-4877.12019
- Tezak, B., Bentley, B., Arena, M., Mueller, S., Snyder, T., and Sifuentes-Romero, I. (2020). Incubation environment and parental identity affect sea turtle development and hatchling phenotype. *Oecologia* 192, 939–951. doi: 10.1007/s00442-020-04643-7
- Tosches, M. A., Yamawaki, T. M., Naumann, R. K., Jacobi, A. A., Tushev, G., and Laurent, G. (2018). Evolution of pallium, hippocampus, and cortical cell

- types revealed by single-cell transcriptomics in reptiles. *Science* 360, 881–888. doi: 10.1126/science.aar4237
- Trník, M., Albrechtová, J., and Kratochvíl, L. (2011). Persistent effect of incubation temperature on stress-induced behavior in the Yucatan banded gecko (*Coleonyx elegans*). *J. Comp. Psychol.* 125, 22–30. doi: 10.1037/a0021186
- Vaiserman, A. M., and Koliada, A. K. (2017). Early-life adversity and long-term neurobehavioral outcomes: Epigenome as a bridge? *Hum. Genomics* 11:34. doi: 10.1186/s40246-017-0129-z
- Valverde, R. A., Wingard, S., Gómez, F., Tordoir, M. T., and Orrego, C. M. (2010). Field lethal incubation temperature of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryos at a mass nesting rookery. 12, 77–86. doi: 10.3354/esr00296
- Vu, V. Q. (2011). *ggbiplot: A ggplot2 based biplot. R package version 0.55*. Available online at: <http://github.com/vqv/ggbiplot> (accessed Dec. 28, 2020).
- Wallace, B. P., Sothlerland, P. R., Spotila, J. R., Reina, R. D., Franks, B. F., and Paladino, F. V. (2004). Biotic and abiotic factors affect the nest environment of embryonic Leatherback Turtles, *Dermochelys coriacea*. *Physiol. Biochem. Zool.* 77, 423–432. doi: 10.1086/420951
- Wallace, B. P., Sothlerland, 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 turtles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 145, 524–532. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.08.040
- Weber, C., Zhou, Y., Lee, J. G., Looger, L. L., Qian, G., Ge, C., et al. (2020). Temperature-dependent sex determination is mediated by pSTAT3 repression of Kdm6b. *Science* 368, 303–306. doi: 10.1126/science.aaz4165
- Wibbels, T., Bull, J. J., and Crews, D. (1991). Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination? *J. Exp. Zool.* 260, 130–134. doi: 10.1002/jez.1402600117
- Wibbels, T., Gideon, P., Bull, J. J., and Crews, D. (1993). Estrogen- and temperature-induced medullary cord regression during gonadal differentiation in a turtle. *Differentiation* 53, 149–154. doi: 10.1111/j.1432-0436.1993.tb00703.x
- Wickham, H., and Bryan, J. (2019). *readxl: Read Excel Files. R package version 1.3.1*. Available online at: <https://CRAN.R-project.org/package=readxl> (accessed Dec. 28, 2020).
- Yntema, C. L., and Mrosovsky, N. (1981). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Can. J. Zool.* 60, 1012–1016. doi: 10.1139/z82-141
- Conflict of Interest:** 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.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Unda-Díaz, Phillips-Farfán, Nava, Lopez-Toledo, Murata, Lajud, Herrera-Vargas, Arreola Camacho, Torner, Fuentes-Farías and Meléndez-Herrera. 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) and the copyright owner(s) 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.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

El manejo de las nidadas cuando son ejecutadas las estrategias de conservación, las características de los hábitats artificiales y los factores ambientales en estos, como la temperatura, la humedad, la granulometría del sedimento, entre otros, pueden influir directa y significativamente en los procesos bioquímicos y fisiológicos importantes para el crecimiento, la reproducción y la locomoción en las tortugas marinas (Dawson, 1975; Cloudsley-Thompson, 1999). Previamente al presente estudio, Herrera-Vargas y colaboradores (2017) demostraron que la reubicación de los huevos de *L. olivacea* a sitios protegidos puede dar lugar a déficits en el desarrollo de las crías machos en comparación con los de los nidos *in-situ*. Debido a esto, es importante entender algunos procesos fisiológicos que pudieran estar alterados por la reubicación de los nidos en las crías hembras de *L. olivacea*

Este trabajo muestra que la reubicación de los huevos tuvo un impacto negativo en el tamaño corporal, la neurogénesis y la ovariogénesis. Los resultados mostraron que las crías de NH presentaron menor masa y tamaño corporal, menor neurogénesis y menor ovariogénesis *versus* crías de NN. Estas diferencias parecieron estar relacionadas con proporciones más bajas de arena gruesa y más altas de limo en los NH. Ditmer y Stapleton (2012) demostraron que el éxito de eclosión aumenta con un tamaño de nidada más grande y granos de arena grandes, por lo que, el tamaño de grano del nido afecta la duración de la incubación. Esta observación tiene consecuencias importantes para los proyectos que implican la transferencia a nidos *ex-situ*, los nidos no deben transferirse a un criadero único y homogéneo. Tal como lo presentan Milton y colaboradores (1997) y Naro-Maciel y colaboradores (1999), las variaciones en las características de los sedimentos de criadero (como el tamaño del grano y la composición mineral) podrían causar alteraciones en la temperatura durante la incubación y, en consecuencia, afectar la proporción de sexos de las crías. Como se puede ver, es necesario que los viveros de tortugas marinas mantengan las características sedimentarias similares a las del origen del nido.

Por otra parte, la temperatura y la humedad, en general, fueron importantes para el desarrollo de las crías. Los NH presentaron menor contenido de humedad y

temperaturas más bajas en comparación con los NN. En los reptiles con determinación del sexo dependiente de la temperatura, el tamaño de la cría está determinado por la temperatura ambiental. Estudios previos han demostrado que las crías incubadas en temperaturas más frías tienden a ser más grandes (Booth *et al.*, 2004; Ischer *et al.*, 2009; Booth *et al.*, 2013), ya que se prolonga el período de incubación (Booth *et al.*, 2004). Un estudio reciente mostró una interacción entre el componente materno, la temperatura de la arena, la humedad y la longitud corporal en crías de la especie *Caretta caretta* (tortuga boba), además, estos autores describieron los efectos diferenciales de la humedad sobre la longitud del cuerpo a lo largo del desarrollo (Tezak *et al.*, 2020). Es por ello, que se ha sugerido que existen diferentes elementos como el factor materno (masa inicial de los huevos. Wallace *et al.*, 2006, Booth *et al.*, 2013), el tamaño de la hembra anidadora (Xavier *et al.*, 2006; Chatting *et al.*, 2018), el gasto metabólico (Rusli *et al.*, 2016) y la absorción de la yema (Stand, 2002), que pueden contribuir a explicar las diferencias observadas en el tamaño de las crías.

El tamaño corporal se correlaciona positivamente con la madurez sexual, el rendimiento reproductivo y la supervivencia (Stearns y Koella, 1986). Siguiendo esta premisa, los individuos de crecimiento lento tendrán un menor rendimiento reproductivo a lo largo de su vida, lo que repercutiría negativamente en el crecimiento de la población. Del mismo modo, los animales de crecimiento lento permanecen más pequeños durante más tiempo como juveniles, lo que podría aumentar el riesgo de mortalidad por depredación (Edmonds *et al.*, 2021), teniendo los individuos más grandes una mayor probabilidad de supervivencia, ya que se ha demostrado que son más rápidos que el resto (Janzen, 1993; Irschick *et al.*, 2005). Recientemente se ha demostrado que las crías de *L. olivacea* con mayor masa corporal desarrollan una mejor respuesta inmunitaria, Robledo-Ávila y colaboradores (2022) demostraron histológicamente que la conservación *ex-situ* promovió el desarrollo del bazo, evidenciado por un mayor índice bazo-somático y mayor densidad de agregados linfoides peri-arteriolares. En los mamíferos así como en los reptiles, el bazo es un órgano importante, ya que forma parte del sistema linfático y es el centro de actividad del sistema inmune desencadenando la defensa humoral, filtra la sangre y elimina los eritrocitos viejos (Kassab *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2019);

Investigaciones sugieren que la temperatura de incubación también puede influir en la capacidad de aprendizaje (Deeming, 2004) inclusive en los reptiles. En un estudio preliminar, Amiel y Shine (2012) descubrieron que las crías obtenidas de huevos de *Bassiana duperreyi* (lagartija de 3 rayas gruesas) incubados bajo diferentes regímenes de temperatura variaban en su capacidad de aprender la ubicación de un refugio seguro durante un ataque simulado de un depredador. Un mejor aprendizaje podría mejorar la adquisición de recursos o la evitación de depredadores (Dukas, 2004), y por lo tanto, favorecer cualquier mecanismo cognitivo subyacente asociado con la capacidad de aprendizaje, por ejemplo, la atención, la memoria espacial, la discriminación visual (Shettleworth, 2009). Estos efectos inducidos por la incubación pueden persistir durante gran parte de la vida del organismo, como se ha demostrado en *B. duperreyi* con relación al tamaño y a la capacidad locomotora (Elphick y Shine 1998). Aunado a esto, en tortugas marinas se ha observado una mayor capacidad de enderezamiento y de desplazamiento hacia el mar, así como una mayor velocidad en el nado (Rivas *et al.*, 2019; Fleming *et al.*, 2021).

Otro aspecto importante durante el desarrollo prenatal y postnatal de los organismos vertebrados es el proceso de la neurogénesis (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002; Garcia-Verdugo *et al.*, 2002; Sawada y Sawamoto, 2013; Paredes *et al.*, 2016), en el que las células madre neurales dan lugar a nuevas células indiferenciadas. Las células madre neurales persisten en la zona ventricular y en la zona subventricular dónde ocurre la división celular (Cameron y Glover, 2015; Jin, 2016). En mamíferos, las células madre neuronales situadas en la zona subventricular dan lugar a neuronas diferenciadas en el hipocampo y algunas de estas células hijas se diferencian en neuronas funcionales que participan en el aprendizaje, la memoria y en la cognición mediante la integración en redes neuronales preexistentes (de Miranda *et al.*; 2017).

En este trabajo se evaluaron dos acontecimientos importantes para la neurogénesis temprana: la proliferación de células en la zona ventricular y la integración de neuronas en corteza dorsomedial y medial. Los datos mostraron que la reubicación de los nidos redujo ambos procesos en las crías de tortuga. En los vertebrados, la neurogénesis del hipocampo es un proceso altamente regulado y conservado, incluye procesos

como la proliferación, migración, diferenciación e integración celular (Altman y Das, 1965; Gage, 2002; Bayer y Altman, 2004; Kuhn *et al.*, 2016; McDonald y Vickaryous, 2018). La proliferación celular y la integración neuronal son necesarias para que cualquier organismo pueda llevar a cabo tareas cognitivas ecológicamente relevantes, como el aprendizaje espacial y la memoria, así como la regulación del eje HPA (Gould *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2010). Algunos estudios sugieren que la parte dorsal del hipocampo está implicado en el aprendizaje y la memoria espacial, mientras que el hipocampo ventral está más asociado a las funciones límbicas y está implicado en procesos como el estrés, la depresión o la ansiedad (Kheirbek y Hen, 2011; Hyer *et al.*; 2016; Schoenfeld *et al.*; 2016; Brooker *et al.*; 2017; Loxton y Canales, 2017).

En los reptiles, las células recién nacidas del surco lateral y septomedial migran durante varios días y maduran como neuronas a medida que se acercan a las cortezas. El pico de la neurogénesis se produce durante el desarrollo embrionario, sin embargo, se sabe que este proceso persiste en etapas postnatales (McDonald y Vickaryous, 2018). De esta manera, es muy probable que las células BrdU+ que se han observado en este trabajo sean progenitores neuronales. No obstante, se deberán realizar futuros estudios de mapeo celular y confirmar el linaje celular producidas en las tortugas marinas recién emergidas. Por otro lado, las crías de los NH mostraron un menor número de células proliferativas BrdU+ poco 6 horas después de la emergencia del nido, lo que sugiere que un número reducido de precursores neuronales migrarán a las cortezas y menos neuronas o células gliales se diferenciarán y se integrarán en circuitos funcionales. Al mismo tiempo, la menor densidad de células NeuN+ observada en las cortezas dorsomedial y medial de las crías de NH puede reflejar una deficiente integración neuronal, aún se desconoce si estas crías en etapas juveniles o adultas tendrán algún déficit para el rendimiento cognitivo y conductual a corto y largo plazo. Sin embargo, la evidencia reciente en lagartos muestra que una alteración en la neurogénesis durante el desarrollo tiene efectos negativos ya sea en la vida temprana o durante la edad adulta (Amiel *et al.*, 2017; Dayananda y Webb, 2017). Así, una alteración de la neurogénesis temprana en las tortugas marinas puede producir una memoria espacial deficiente, rutas migratorias alteradas y dificultades para regresar a la playa donde nacieron (filopatría). Así mismo, se ha demostrado que el estrés

prenatal modula el proceso de neurogénesis en la etapa adulta, aumentando la probabilidad de desarrollar disrupciones neurobiológicas y conductuales en edad adulta (Kippin *et al.*; 2015). Estudios en mamíferos específicamente en humanos han establecido que la exposición de las madres embarazadas a situaciones sociales, emocionales u hostiles puede hacer que su descendencia sea susceptible de padecer enfermedades mentales como la esquizofrenia, la depresión y los déficits cognitivos (Eisch *et al.*, 2008; Provencal y Binder, 2014). Tanto la genética, las infecciones virales, experiencias adversas o intervenciones antropogénicas prenatales desempeñan un papel crucial, ya que tienen la capacidad de suprimir la proliferación celular en edad adulta (Gould *et al.*, 1999a) así como la morfología de las neuronas del hipocampo (Gould *et al.*, 1999b; Herrera y cols., 2017). Sin embargo, faltan más estudios por evaluar para determinar su efecto en las siguientes etapas de desarrollo en *L. olivacea* ya que se ha demostrado que la exposición a un entorno enriquecido, tareas de aprendizaje o el ejercicio voluntario mejoran la neurogénesis del hipocampo (Bekinschtein *et al.*; 2011)

Del mismo modo, en este estudio se observa que la estrategia de incubación en NH se asoció a una disminución en la proliferación de células ováricas en las crías de tortuga, evidenciada por una baja en el marcaje de células BrdU+. Las hormonas sexuales, que se clasifican en términos generales como estrógenos, progestágenos y andrógenos, se encuentran tanto en los machos como en las hembras, pero en diferentes concentraciones. El estradiol es la forma de estrógeno dominante en muchas especies y parece aumentar la proliferación celular y previene la muerte de las células en la zona subgranular, mediado a través de los receptores de estrógeno (ERs; Trivino-Paredes *et al.*, 2016). Se ha descrito que el desarrollo de las gónadas en *L. olivacea*, comienza en el tercio medio de la incubación (día 16 de desarrollo), cuando las células germinales primordiales se acumulan en la base de la cresta gonadal (Merchant-Larios *et al.*, 1997). En esta especie, las temperaturas cálidas (32-33 °C) promueven la formación del ovario al estimular la producción de estradiol y aromatasa de la gónada indiferenciada y los tejidos adyacentes: el mesonefros y las glándulas interrenales (Wibbels *et al.*, 1991, 1993; Ewert *et al.*, 2004; Freedberg *et al.*, 2006; Díaz-Hernández *et al.*, 2015, 2017). En mamíferos la formación de los ovarios comienza

desde etapas tempranas del desarrollo, este proceso implica la segregación de las células germinales primordiales (PGC) de los linajes somáticos, la migración desde el saco vitelino y la colonización de las crestas genitales, donde continúan una amplia proliferación mitótica que alcanza un valor máximo a los 18,5 días después de la fecundación en ratas. Posteriormente, la actividad mitótica disminuye, la mayoría de las oogonias entran en meiosis para producir un conjunto de ovocitos detenidos en el estadio diploteno de la primera división meiótica, mientras que la actividad apoptótica se reanuda (de Felici *et al.*, 2004).

El desarrollo ovárico normal proporciona un equilibrio entre la proliferación y la apoptosis de las células germinativas, que es el principal fenómeno para establecer el máximo potencial reproductivo de las hembras adultas (Poulain *et al.*, 2012). El pico más alto de proliferación de células ováricas no se conoce para *L. olivácea*, sin embargo, la foliculogénesis y la entrada del ovocito en la meiosis ocurren en los meses 3-5 posteriores a la eclosión (Merchant-Larios *et al.*, 1989). No se han evaluado los resultados de la reducción de la proliferación de células germinales en hembras de tortugas jóvenes o adultas. En roedores, la ausencia de células germinales no permite el desarrollo del folículo ovárico (McLaren, 1984) o resulta en la degeneración del folículo (Ray y Potu, 2010; Bishop *et al.*, 2019). En este estudio se puede observar cualitativamente una disminución en el tamaño del ovario, probablemente como resultado de la reducción de la proliferación celular. En mamíferos, este efecto sugiere cambios, como el retraso en la formación de los ovarios o incluso la infertilidad (Monniaux, 2018). Ristić y colaboradores (2019), demostraron que en ratas, la exposición prenatal a dexametasona (Dx) considerado como un glucocorticoide, conduce a una nueva programación del desarrollo del sistema reproductivo a nivel de la glándula pituitaria y del ovario. En concreto, la exposición a Dx durante el periodo más vulnerable del desarrollo de la hipófisis redujo notablemente el número de células gonadotrópicas, lo que contribuye en parte a la disminución del volumen de toda la glándula durante el desarrollo de la rata (Ristić *et al.*, 2014). Los cambios que se establecen durante el desarrollo fetal son de larga duración y persisten durante el desarrollo postnatal (Ristić *et al.*, 2016). Otro estudio demostró que la exposición prenatal a Dx disminuye el número de folículos ováricos primordiales, primarios y

secundarios (Ristić *et al.*, 2008), el volumen del ovario fetal y la tasa de proliferación de las células germinativas, mientras que la tasa apoptótica aumenta (Ristić *et al.*, 2019); en consecuencia, una reducción en el número de células germinativas en el ovario puede relacionarse con la reducción del potencial reproductivo en la hembra en la edad adulta.

El periodo fetal es crítico para el desarrollo de los ovarios y la futura fertilidad adulta, ya que el número final de ovocitos accesibles para la reproducción de la siguiente generación se define en su mayor parte en ese momento (Poulain *et al.*, 2012). Para la biología de un organismo el sistema reproductivo es muy importante, si se experimentan impactos adversos en una ventana crítica del desarrollo, la dinámica normal del proceso de desarrollo del ovario puede verse alterada, con efectos a largo plazo en la estructura y función del ovario (Ristić *et al.*, 2019).

No se descarta que algunos otros factores abióticos, otras variables como la manipulación durante la translocación (Eckert y Eckert, 1990; Booth y Astill, 2001a, b; Reece *et al.*, 2002), los parámetros microbiológicos (Patino-Martínez *et al.*, 2012) o detalles de procedimiento pueden explicar los cambios de desarrollo. En futuros estudios se debería registrar la temperatura dentro del nido durante todo el periodo de incubación y recoger arena del centro del nido. Esto debería verificar la contribución micro ambiental a los efectos de la reubicación de la nidada en el desarrollo de las crías de tortuga. Estos estudios darán lugar a recomendaciones para la gestión de los criaderos con el fin de maximizar el potencial de desarrollo de las tortugas marinas.

REFERENCIAS

- Abreu-Grobois, F.A. 2016. **Generalidades De Las Tortugas Marinas**. En V Koch, H Peckham, EA Cuevas-Flores, E Peralta-Buendía, MT Luna, K López-Sánchez, MA Castro-Martínez, C Delgado-Trejo, R Márquez-Millán, C Peña-Flores, AR Barragán- Rocha and R Briseño-Dueñas (Ed). *Las tortugas marinas en México: Logros y perspectivas para su conservación*. México. (pp. 21-34). DF: Soluciones Ambientales ITZENI, A.C.
- Abush, H. and I. Akirav. 2013. **Cannabinoids Ameliorate Impairments Induced By Chronic Stress To Synaptic Plasticity And Short-Term Memory**. *Neuropsychopharmacology*. 38(8):1521-34. doi: 10.1038/npp.2013.51.
- Ackerman, R. A. 1997. **The Nest Environment and the Embryonic Development of Sea Turtles**. In: P. L. Lutz and J. A. Musick, Eds, *The Biology of Sea Turtles*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 1997, pp. 83
- Altman, J. 1962. **Are New Neurons Formed In The Brains Of Adult Mammals?**. *Science*. 135: 1127-1128. PMID 13860748
- Altman, J. and S. A. Bayer. 1990. **Migration And Distribution Of Two Populations Of Hippocampal Granule Cell Precursors During The Perinatal And Postnatal Periods**. *Journal of Comparative Neurology*. 301: 365-381. doi: 10.1002/Cne.903010304
- Alvarez-Buylla, A. and J. M. Garcia-Verdugo. 2002. **Neurogenesis In Adult Subventricular Zone**. *The Journal of Neuroscience*. 22: 629-634. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002
- Amiel, J.J. and R. Shine. 2012. **Hotter Nests Produce Smarter Young Lizards**. *Biol Lett*. 8(3):372-374. doi:10.1098/rsbl.2011.1161
- Baldwin, J. E., K. Gyruis, Mortimer, and A. Patak. 1989. **Anaerobic Metabolism During Dispersal Of Green And Loggerhead Turtle Hatchlings**. *Comp Bio and Phys, Part A, Physiology*. 94: (4) 663-665. doi.org/10.1016/0300-9629(89)90613-0

- Bekinschtein., P., C. A. Oomen., L.M., Saksida., T.J., Bussey. **Effects Of Environmental Enrichment And Voluntary Exercise On Neurogenesis, Learning And Memory, And Pattern Separation: BDNF As A Critical Variable?** *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22:536–42. doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.002
- Benabib N.M., and I.E. Cruz. 1987. **Resultados Preliminares Del Trabajo Realizado En Importantes Playas De Anidación De *Dermachelys Coriácea* En Michoacán.** Cm Gómez A., S. (Ed) **Memorias Del VII Simposio Latinoamericano Sobre Oceanografía Biológica.** Acapulco, Gro. Noviembre de 1981. 625-636.
- Bjorndal, K.A., and J.B. Jackson. 2002. **Roles of Sea Turtles in Marine Ecosystems: Reconstructing the Past.** In book: *The Biology of Sea Turtles, Volume II.* pp.259-273
- Booth, D.T. and A. Evans. 2011. **Warm Water And Cool Nests Are Best: How Global Warming Might Influence Hatchling Green Turtle Swimming Performance.** *PLoS ONE* 6(8): e23162. doi: 10.1371/journal.pone.0023162
- Booth., D.T., E. Burgess., J. McCosker., J.M., Lanyon. 2004. **The Influence Of Incubation Temperature On Post-Hatching Fitness Characteristics Of Turtles.** *Int. Congr. Ser.* 1275:226–233. doi:10.1016/j.ics.2004.08.057
- Bradshaw, S. D. and E. Fontaine-Bertrand. 1970. **Measure Of Corticosteroids In Reptilian And Avian Plasma By Fluometry And By Competitive Protein-Binding Radioassay.** *Comp. Biochem. Physiol.* 36, 37-48. doi.org/10.1016/0010-406X(70)90648-1
- Bradshaw, S.D. 1975. **Osmoregulation And Pituitary-Adrenal Function In Desert Reptiles.** *Gen. Comp. Endocrinol.* 25, 230-248. doi.org/10.1016/0016-6480(75)90194-X
- Brooker, S.M., K.T. Gobeske., J. Chen., C.Y. Peng., and J.A. Kessler. 2017. **Hippocampal Bone Morphogenetic Protein Signaling Mediates Behavioral Effects Of Antidepressant Treatment.** *Molecular Psychiatry.* 22, 910–919. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.160>

- Brothers, J R. and K.J. Lohmann. 2015. **Evidence For Geomagnetic Imprinting And Magnetic Navigation In The Natal Homing Of Sea Turtles.** *Current Biology.* 25(3):392- 396. doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.035
- Cameron, H.A. and R.D.G McKay. 1999. **Restoring Production Of Hippocampal Neurons In Old Age.** *Nat. Neurosci.* 2(10):894-7. doi: 10.1038/13197.
- Cameron, H.A., and L.R. Glover. 2015. **Adult Neurogenesis: Beyond Learning And Memory.** *Annual Review of Psychology.* 66, 53–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-015006>
- Cannon, W.B. 1914. **Bodily Changes In Pain, Hunger, Fear And Rage.** New York: D. Appleton & Company
- Chacón, D.; J. Sánchez., J. Calvo and J. Ash. 2007. **Manual Para El Manejo Y La Conservación De Las Tortugas Marinas De 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. 103p.
- Cloudsley-Thompson, J. 1999. **Discovery Of A Sexual Population Of Tityus Serrulatus, One Of The Morphs Within The Complex Tityus Stigmurus (Scorpiones, Buthidae).** Corpus ID: 55304957
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA. 2017. **Coordinación General Del Servicio Meteorológico Nacional Proyecto De Bases De Datos Climatológicos.** <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado-estado=mich>
- CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). 2010. **Programa De Acción Para La Conservación De Las Especies (PACE): Tortuga Laúd (Dermochelys coriacea).** CONANP SEMARNAT. México. 46 pp.
- Dagyte, G., E.A. Van der Zee., F. Postema., P.G. Luiten., J.A. den Boer., and A. Trentani. 2009. **Chronic But Not Acute Foot-Shock Stress Leads To Temporary**

- Suppression Of Cell Proliferation In Rat Hippocampus.** *Neuroscience.* 162(4), 904-913. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.053.
- de Felici, M., M. L. Scaldaferrri., M. Lobascio., S. Iona., V. Nazzicone., F.G. Klinger., and D. Farini. 2004. **Experimental Approaches To The Study Of Primordial Germ Cell Lineage And Proliferation.** *Hum. Reprod. Update.* 10:197 -206. doi.10.1093/humupd/dmh020
- de Miranda, A.S., C.J. Zhang., A. Katsumoto and A.L. Teixeira, A. L. 2017. **Hippocampal Adult Neurogenesis: Does The Immune System Matter?** *Journal of the Neurological Sciences.* 372: 482–495. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.10.052>
- Deeming, D.C. 2004. **Reptilian Incubation: Environment, Evolution And Behaviour.** Nottingham University Press, Sheffield
- Deeming, D.Ch. 2004. **Post-Hatching Phenotypic Effects Of Incubation In Reptiles.** In book: *Reptilian Incubation: Behaviour and Environment* (pp.229-252)Publisher: Nottingham University
- Denardo, D.F., and P. Licht. 1993. **Effects Of Corticosterone On Social Behavior Of Male Lizard.** *Hormones and Behavior.* 27: 184–199. doi.org/10.1006/hbeh.1993.1014
- Denver, R.J. 2009. **Structural And Functional Evolution Of Vertebrate Neuroendocrine Stress Systems. Trends In Comparative Endocrinology And Neurobiology.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1163, 1-16. doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04433.x
- Ditmer, M.A., and S.P. Stapleton. 2012. **Factors Affecting Hatch Success Of Hawksbill Sea Turtles On Long Island, Antigua, West Indies.** *PLoS One.* 7(7):e38472. doi: 10.1371/journal.pone.0038472.
- Dukas, R. 2004. **Evolutionary Biology Of Animal Cognition. Annual Review Of Ecology, Evolution, And Systematics.** 35 (ArticleType: research-article/Full publication date: 2004/Copyright 2004 Annual Reviews):347–374

- Eckert, K., K. Bjorndal, A. Abreu-Grobois and M Donnelly. 2000. **Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas.** Pennsylvania: Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4(235).
- Edmonds, D., M.J. Dreslik., J.E. Lovich., T.P. Wilson., and C.H. Ernst. 2021. **Growing as slow as a turtle: Unexpected maturational differences in a small, long-lived species.** *PloS One*, 16 (11), e0259978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259978>
- Eisch, A.J., H.A. Cameron., J.M. Encinas., L.A. Meltzer., G.L. Ming, and L.S. Overstreet-Wadiche. 2008. **Adult Neurogenesis, Mental Health, And Mental Illness: Hope Or Hype?** *J Neurosci.* 28:11785–91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3798-08.2008
- Elphick, M.J., and R. Shine. 1998. **Longterm Effects Of Incubation Temperatures On The Morphology And Locomotor Performance Of Hatchling Lizards (*Bassiana Duperreyi*, *Scincidae*).** *Biol J Linn Soc.* 63(3):429–447. doi:10.1111/j.1095-8312.1998.tb01527.x
- Emack, J. and S.G. Matthews. 2011. **Effects Of Chronic Maternal Stress On Hypothalamo- Pituitary-Adrenal (HPA) Function And Behavior: No Reversal By Environmental Enrichment.** *Hormones and Behavior.* 60(5), 589-598. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.08.008
- Fiala, J.C., B. Allwardt, K.M. Harris. 2002. **Dendritic Spines Do Not Split During Hippocampal LTP Or Maturation.** *Nat Neurosci.* 5(4):297-8. doi: 10.1038/nn830. PMID: 11896399.
- FitzSimmons, N.N., C.J. Limpus, J.A. Norman, A.R. Goldizen, J.D. Miller y C. Moritz. 1997. **Philopatry Of Male Marine Turtles Inferred From Mitochondrial DNA Markers.** *Proc Natl Acad Sci.* 94(16): 8912–8917. doi: 10.1073/pnas.94.16.8912
- Foley, A.M., S.A. Peck y G.R. Harman. 2006. **Effects Of Sand Characteristics And Inundation On The Hatching Success Of Loggerhead Sea Turtle (*Caretta Caretta*) Clutches On Lowrelief Mangrove**

- Frandsen, R.D and T.L. Spurgeon. 1995. **Anatomía Y Fisiología De Los Animales Domésticos**. (5a ed.) Interamericana, Mc Graw-Hill, México.
- García-Verdugo, J.M., S. Ferrón., N. Flames., L. Collado., E. Desfilis., E. Font. 2002. **The Proliferative Ventricular Zone In Adult Vertebrates: A Comparative Study Using Reptiles, Birds, And Mammals**. *Brain Research Bulletin* 57(6):765–75. doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00769-9
- Gould, E., A. Beylin., P. Tanapat., A., Reeves., T.J. Shors. 1999a. **Learning Enhances Adult Neurogenesis In The Hippocampal Formation**. *Nat Neurosci.* 2:260–5. doi: 10.1038/6365
- Gould, E., A.J. Reeves., M. Fallah., P. Tanapat., C.G. Gross., and E. Fuchs. 1999b. **Hippocampal Neurogenesis In Adult Old World Primates**. *Proc Natl Acad Sci.*1999;96:5263–7. doi: 10.1073/pnas.96.9.5263
- Gould, E., B.S. McEwen., P. Tanapat., L.A.M. Galea, and E. Fuchs,E. 1997. **Neurogenesis In The Dentate Gyrus Of The Adult Tree Shrew Is Regulated By Psychosocial Stress And NMDA Receptor Activation**. *The Journal of Neuroscience* 17:2492-2498. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-07-02492.1997
- Graeff, F.G. 2011. **Defense-Related Emotions In Humans**. *Psychology & Neuroscience.* 4(2):183-189. doi:10.3922/j.psns.2011.2.003
- Habib N., Y. Li, M. Heidenreich, L. Swiech, I. Avraham-Davidi, J. Trombetta, C. Hession, F. Zhang, A. Regev. 2016. **Div-Seq: Single-Nucleus Rna-Seq Reveals Dynamics Of Rare Adult Newborn Neurons**. *Science.* 353(6302):925-8. doi: 10.1126/science.aad7038
- Hafting, T., M. Fyhn., S. Molden., M.B. Moser., and E.I. Moser. 2005. **Microstructure Of A Spatial Map In The Entorhinal Cortex**. *Nature.* 11; 436(7052):801-6. doi: 10.1038/nature03721
- Hyer, M.M., T.J. Hunter., J. Katakam., T. Wolz, and E.R. Glasper. 2016. **Neurogenesis And Anxiety-Like Behavior In Male California Mice During The Mate's**

- Postpartum Period.** *European Journal of Neuroscience.* 43, 703–709. <https://doi.org/10.1111/ejn.13168>
- Irschick, D.J., A. Herrel., B. Vanhooydonck., K. Huyghe., and R.V. Damme. 2005. **Locomotor Compensation Creates A Mismatch Between Laboratory And Field Estimates Of Escape Speed In Lizards: A Cautionary Tale For Performance-To-Fitness Studies.** *Evolution.* 59(7):1579–1587. doi:10.1111/j.0014-3820.2005.tb01807.x
- Ischer, T., K. Ireland., and D.T. Booth. 2009. **Locomotion Performance Of Green Turtle Hatchlings From The Heron Island Rookery, Great Barrier Reef.** *Mar. Biol.*156:1399–1409. doi: 10.1007/s00227-009-1180-7.
- Foley, A. S.A. Peck., G.R. 2006. **Effects of Sand Characteristics and Inundation on the Hatching Success of Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) Clutches on Low-Relief Mangrove Islands in Southwest Florida.** *Chelonian Conservation and Biology.* 5(1): 32-41pp. doi:10.2744/1071-8443(2006)5[32:EOSCAI]2.0.CO;2
- IUCN/SSC Peter Scott Action Plan Fund (Sultanato de Oman). **Unión Internacional Para La Conservación De La Naturaleza Y De Los Recursos Naturales.** 1995. ISBN 2-8317-0267-4
- Janzen, F.J. 1993. **An Experimental Analysis Of Natural Selection On Body Size Of Hatchling Turtles.** *Ecology* 74(2):332–341. doi.org/10.2307/1939296
- Jeffrey, D.M. 1997. **Reproduction In Sea Turtles. The Biology Of Sea Turtle.** Edit. Lutz, P. y J. A. Musick. CRC Press, Boca Raton, Florida. 430 pp.
- Jinn, X. 2016. **The Role Of Neurogenesis During Development And In The Adult Brain.** *European Journal of Neuroscience.* 44, 2291–2299. <https://doi.org/10.1111/ejn.13251>
- Kapoor, A., and S. Matthews. 2008. **Prenatal Stress Modifies Behavior And Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function In Female Guinea Pig Offspring: Effects Of Timing Of Prenatal Stress And Stage Of Reproductive Cycle.** *Endocrinology.* 149 (12): 6406 – 6415. doi: 10.1210/en.2008-0347

- Kempermann, G., D. Gast, G. Kronenberg, M. Yamaguchi, y F. H. Gage. 2003. **Early Determination And Long-Term Persistence Of Adult-Generated New Neurons In The Hippocampus Of Mice.** *Development and Disease.* 130(2):391–99. doi.org/10.1242/dev.00203
- Kempermann, G., H.G. Kuhn., and F.H. Gage. 1997. **More Hippocampal Neurons In Adult Mice Living In An Enriched Environment.** *Nature.* 3; 386(6624):493-5. doi: 10.1038/386493a0. PMID: 9087407
- Kheirbek, M.A., A.R. Hen. 2011. **Dorsal Vs Ventral Hippocampal Neurogen- Esis: Implications For Cognition And Mood.** *Neuropsychopharmacology,* 36, 373–374. https://doi.org/10.1038/npp.2010.148
- Kim J.J., and K.S. Yoon. 1998. **Stress: Metaplastic Effects In The Hippocampus.** *Trends in Neurosciences.* 21(12):505-509. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01322-8
- Kippin, T.E., J.C. Campbell., K. Ploense., C.P. Knight., and J. Bagley. 2015. **Prenatal Stress And Adult Drug-Seeking Behavior: Interactions With Genes And Relation To Nondrugrelated Behavior.** *Adv Neurobiol.* 10:75–100. doi: 10.1007/978-1-4939-1372-5_5
- Kuhn, H.G., H. Dickinson-Anson., F.H. Gage. 1996. **Neurogenesis In The Dentate Gyrus Of The Adult Rat: Age-Related Decrease Of Neuronal Progenitor Proliferation.** *J Neurosci.* 6(6):2027-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-06-02027.1996
- Lemaire, V.M., M. Koehl, L. Moal and D. N. Abrous. 2000. **Prenatal Stress Produces Learning Deficits Associated With An Inhibition Of Neurogenesis In The Hippocampus.** *Proc Natl Acad Sci.* 26;97(20):11032-7. doi: 10.1073/pnas.97.20.11032.
- Lledo, P. M., M. Alonso y M. S. Grubb. 2006. **Adult Neurogenesis And Functional Plasticity In Neuronal Circuits.** *Nat Rev Neurosci.* 7(3):179-93. doi: 10.1038/nrn1867.

- López-García, C., A. Molowny, J.M. García-Verdugo, and I. Ferrer. 1988. **Delayed Postnatal Neurogenesis In The Cerebral Cortex Of Lizards.** *Brain Res.* 1; 471(2):167-74. doi: 10.1016/0165-3806(88)90096-x. PMID: 3179748.
- Loxton, D., and J.J. Canales. 2017. **Long-Term Cognitive, Emotional And Neurogenic Alterations Induced By Alcohol And Methamphetamine Exposure In Adolescent Rats.** *Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 74, 1–8. doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.11.003
- Lubbers, K., J. R. Wolff, and M. Frotscher. 1985. **Neurogenesis Of Gabaergic Neurons In The Rat Dentate Gyrus: A Combined Autoradiographic And Immunocytochemical Study.** *Neurosci. Lett.* 62, 317-322. doi: 10.1016/0304-3940(85)90568-3
- Márquez, R. 1996. **Las Tortugas Y Nuestro Tiempo.** 1° Ed. Fondo de Cultura Económica. México, 197p
- Márquez, R. 2000. **Las Tortugas Marinas Y Nuestro Tiempo.** 2ª ed. México DF: Fondo de Cultura Económica.
- Márquez, R., A. Villanueva and C. Peña-Flores. 1976. **Sinopsis De Datos Biológicos Sobre La Tortuga Golfina *Lepidochelys Olivacea* (Eschscholtz, 1829).** FAO-INP Sinopsis sobre la pesca. (2):1-67.
- Márquez-García, A. Z., R. Campos-Verduzco, B. S. Castro-Soriano. 2010. **Sedimentología Y Morfología De La Playa De Anidación Para Tortugas Marinas, El Carrizal, Coyuca De Benitez, Guerrero.** *Hidrobiológica.* 20(2): 101-112.
- McEwen, B.S. 2008. **Central Effects Of Stress Hormones In Health And Disease: Understanding The Protective And Damaging Effects Of Stress And Stress Mediators.** *Eur J Pharmacol.* 583:174–185. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.071
- McEwen, B.S., C. Nasca, and J.D. Gray. 2015. **Stress Effects On Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, And Prefrontal Cortex.** *Neuropsychopharmacology.* 41(1):3-23. doi: 10.1038/npp.2015.171

- McKlveen, J.M., B. Myers, J.P. Herman. 2015. **The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator Of Autonomic, Neuroendocrine And Behavioural Responses To Stress.** *J Neuroendocrinol.* 27:446–456. doi: 10.1111/jne.12272
- Milton, S.L., A.A. Schulman., and P.L. LUTZ. 1997. **The Effect Of Beach Nourishment With Aragonite Versus Silicate Sand On Beach Temperature And Loggerhead Sea Turtle Nesting Success.** *Journal Of Coastal Research*, vol. 13, no. 3, p. 904-915.
- Ming, G.L., H. Song. 2011. **Adult Neurogenesis In The Mammalian Brain: Significant Answers And Significant Questions.** *Neuron.* 70(4):687-702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
- Morales-Medina, J.C., F. Sánchez, G. Flores, Y. Dumont, and R. Quirion. 2009. **Morphological Reorganization After Repeated Corticosterone Administration In The Hippocampus, Nucleus Accumbens And Amygdala In The Rat.** *J Chem Neuroanat.* 38(4):266–72. doi: 10.1016/j.jchemneu.2009.05.009
- Mortimer, J.A. 1990. **The Influence Of Beach Sand Characteristics On The Nesting Behavior And Clutch Survival Of Green Turtles (*Chelonia Mydas*).** *American Society of Ichthyologists and Herpetologist.* 3: 802-817
- Mrosovsky, N. 1994. **Sex Ratios Of Sea Turtles.** *Journal of Experimental Zoology.* 270: 16-27. doi.org/10.1002/jez.1402700104
- Mrosovsky, N. and S.F. Kingsmiix. 1985. **How Turtles Find The Sea.** *Zeitschrift für Tierpsychologie.* 67(1): 237-256. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1985.tb01392.x>
- Myers, B., J.M. McKlveen., J.P. Herman. 2014. **Glucocorticoid Actions On Synapses, Circuits, And Behavior: Implications For The Energetics Of Stress.** *Front Neuroendocrinol.* 35:180–196. doi:10.1016/j.yfrne.2013.12.003
- Myers, B.J., M. McKlveen., and J.P. Herman. 2012. **Neural Regulation Of The Stress Response: The Many Faces Of Feedback.** *Cell Mol Neurobiol.* 32:683–694. doi: 10.1007/s10571-012-9801-y.

- Nadarajah, B. J.E. Brunstrom., J. Grutzendler., R.O. Wong., and A.L. Pearlman. 2001. **Two Modes Of Radial Migration In Early Development Of The Cerebral Cortex.** *Nat Neurosci* 4:143–150.
- Naro-Maciel, E., N. Mrosovsky., and M.A. Marcovaldi. 1999. **Thermal Profiles Of Sea Turtle Hatcheries And Nesting Areas At Praia Do Forte, Brazil.** *Chelonian Conservation and Biology*, vol. 3, no. 3, p. 407-413.
- Norma Oficial Mexicana **NOM-059-SEMARNAT-2010.** Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para la inclusión, exclusión o cambio de listas de especies en riesgo. D. O. F. 30/12/2010.
- Norma Oficial Mexicana **NOM-126-SEMARNAT-2000.** Por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional. D.O.F. 20/03/2001.
- Nottebohm, F. 1989. **From Bird Song To Neurogenesis.** *Sci Am.* 260(2):74-9. doi:10.1038/scientificamerican0289-74. PMID: 2643827.
- O'Keefe, J. and J. Dostrovsky. 1971. **The Hippocampus As A Spatial Map. Preliminary Evidence From Unit Activity In The Freely-Moving Rat.** *Brain Res.* 34, 171-175. doi: 10.1016/0006-8993(71)90358-1
- Ormerod, B.K., T.T. Lee., and L.A. Galea. 2003. **Estradiol Initially Enhances But Subsequently Suppresses (Via Adrenal Steroids) Granule Cell Proliferation In The Dentate Gyrus Of Adult Female Rats.** *Journal of Neurobiology*, 55, 247–260. doi.org/10.1002/neu.10181
- Piatti, V.C., M. S. Esposito., and A.F. Schinder. 2006. **The Timing Of Neuronal Development In Adult Hippocampal Neurogenesis.** *Neuroscientist* 12, 463–468. doi.org/10.1177/1073858406293538

- Pitman R. K., A. M. Rasmusson., K. C. Koenen., L. M Shin., S. P. Orr., M. W. Gilbertson., M. R. Milad., and I. Liberzon. 2012. **Biological Studies Of Post-Traumatic Stress Disorder**. *Nat Rev Neurosci* 13:769–787. doi: 10.1038/nrn3339
- Poloczanska, E. S., C. J. Limpus, y G. C. Hays. 2009. **Vulnerability Of Marine Turtles To Climate Change**. In: DW Sims, (ed): *Advances in Marine Biology*, Vol. 56, Burlington: Academic Press. pp. 151-211. rformance. PLoS ONE 6(8): e23162.
- Poulain, M., N. Frydman., C. Duquenne., T. N'Tumba -Byn., A. Benachi., R. Habert., V. Rouiller – Fabre., G. Livera. 2012. **Dexamethasone Induces Germ Cell Apoptosis In The Human Fetal Ovary**. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(10):E1890-7. doi: 10.1210/jc.2012-1681
- Pritchard, P. 1995. **Recovered Sea Turtle Populations And U.S. Recovery Team Efforts**. In: K. Bjorndal (Ed) *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press. Washington, DC, 503-511 p.
- Provencal, N., E.B. Binder. 2014. **The Effects Of Early Life Stress On The Epigenome: From The Womb To Adulthood And Even Before**. *Exp Neurol.* 268:10-20. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.09.001.
- Pryce C.R. 2008. **Postnatal Ontogeny Of Expression Of The Corticosteroid Receptor Genes In Mammalian Brains: Inter-Species And Intra-Species Differences**. *Brain Res Rev* 57:596–605. doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.005
- Raymond, P.A., S.S.Jr Easter SS. 1983. **Postembryonic Growth Of The Optic Tectum In Goldfish. I. Location Of Germinal Cells And Numbers Of Neurons Produced**. *J Neurosci.* 3(5):1077–1091
- Richter, W., and D. Kranz, D. 1981. **Autoradiographic Investigations On Postnatal Proliferative Activity Of The Telencephalic And Diencephalic Matrix-Zones In The Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*), With Special References To The Olfactory Organ**. *Zeitschrift fur mikroskopisch-anatomische Forschung*, 95(6), 883-904

- Ristić, N., N. Nestorović., M. Manojlović -Stojanoski., B. Filipović., B. Šošić -Jurjević., V. Milošević., M. and Sekulić. 2008. **Maternal Dexamethasone Treatment Reduces Ovarian Follicle Number In Neonatal Rat Offspring**. *J. Microsc.* 232(3): 549 – 557. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02117.x
- Ristić, N., N. Nestorović., M. Manojlović -Stojanoski., I. Medigović., S. Trifunović., B. Šošić – Jurjević., and V. Milošević. 2014. **Exposure To Dexamethasone Reduces Pituitary Volume And Gonadotropic Cell Number In Rat Fetuses**. *Acta Histochem.* 116(5):973-80. doi: 10.1016/j.acthis.2014.04.003
- Ristić, N., W. Severs., N. Nestorović., I. Jarić., M. Manojlović -Stojanoski., S. Trifunović., L. Pendovski and V. Milošević. 2016. **Effects Of Prenatal Dexamethasone On The Rat Pituitary Gland And Gonadotropic Cells In Female Offspring**. *Cells Tissues Organs.* 201(2):148-58. doi: 10.1159/000443987
- Ristić, N; N. Nestorović., M. Manojlović-Stojanoski., S. Trifunović., V. Ajdžanović., B. Filipović; L. Pendovski., and V. Milošević. 2019. **Adverse Effect Of Dexamethasone On Development Of The Fetal Rat Ovary**. *Fundam Clin Pharmacol.* 33(2):199-207. doi: 10.1111/fcp.12415.
- Rivas, M. N. Esteban., and A. Marco. 2019. **Potential Male Leatherback Hatchlings Exhibit Higher Fitness Which Might Balance Sea Turtle Sex Ratios In The Face Of Climate Change**. *Clim. Change.* 156 , 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10584-019-02462-1>.
- Saba V. S., C.A. Stock, J.R. Spotila, F.V. Paladino., and P.S. Tomillo. 2012. **Projected Response Of An Endangered Marine Turtle Population To Climate Change**. *Nature Climate Change*, 2(11): 814-820.
- Sapolsky, R.M. 2000. **Stress Hormones: Good And Bad**. *Neurobiology and Disease*, 7, 540-542. doi.org/10.1006/nbdi.2000.0350
- Sawada, M., and K. Sawamoto. 2013. **Mechanisms Of Neurogenesis In The Normal And Injured Adult Brain**. *The Keio Journal of Medicine.* 62, 13– 28. <https://doi.org/10.2302/kjm.2012-0005-RE>

- Schoenfeld, T.J., H.C. McCausland., A.N. Sonti., and H.A. Cameron. 2016. **Anxiolytic Actions Of Exercise In Absence Of New Neurons.** *Hippocampus*, 26, 1373–1378. <https://doi.org/10.1002/hipo.22649>.
- Schwabe, L., M. Joël, B. Roozendaal, O. T. Wolf and M.S. Oitzl. 2012. **Stress Effects On Memory: An Update And Integration.** *Neurosci Biobehav Rev* 36:1740–1749. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002
- Scoville. W.B. and B. Milner,B. 1996. **Loss Of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. 1957.** *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 12, 103-113. [doi:10.1093/NEUCAS/2.4.259-AF](https://doi.org/10.1093/NEUCAS/2.4.259-AF)
- Selye, H.A. 1936. **A Syndrome Produced By Diverse Nocuous Agents.** *Nature*, 138, 32. doi.org/10.1038/138032a0
- Shen, J.M., A.R. Kriegstein, 1986. **Turtle Hippocampal Cortex Contains Distinct Cell Types, Burst-Firing Neurons, And An Epileptogenic Subfield.** *J. Neurophysiol.* 56(6):1626-49. [doi: 10.1152/jn.1986.56.6.1626](https://doi.org/10.1152/jn.1986.56.6.1626).
- Shettleworth, S.J. 2009. **Cognition, Evolution, And Behaviour.** Oxford University Press, New York
- Stearns, S.C., and J.C. Koella. 1986. **The Evolution Of Phenotypic Plasticity In Life-History Traits: Predictions Of Reaction Norms For Age And Size At Maturity.** *Evolución.* 40 (5):893–913. [doi: 10.1111/j.1558-5646.1986.tb00560.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1986.tb00560.x)
- Stewart, M. G., H.A. Davies., C. Sandi., I.V. Kraev., V.V. Rogachevsky., C.J. Peddie., J.J.Rodriguez., M.I. Cordero., H.S. Donohue., P.L.A. Gabbott., and V.I. Popov. 2005. **Stress Suppresses And Learning Induces Plasticity In CA3 Of Rat Hippocampus: A Three-Dimensional Ultrastructural Study Of Thorny Excrescences And Their Postsynaptic Densities.** *Neuroscience* 131(1):43–54. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.031
- Striedter, G.F. 2016. **Evolution Of The Hippocampus In Reptiles And Birds.** *J Comp Neurol.* 15; 524(3):496-517. [doi: 10.1002/cne.23803](https://doi.org/10.1002/cne.23803).

- Taube, J.S., R.U. Muller., and J.B. Jr. Ranck. 1990. **Head-Direction Cells Recorded From The Postsubiculum In Freely Moving Rats. I. Description And Quantitative Analysis.** *J Neurosci.* 10(2):420-35. doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-02-00420.1990
- Tolman, E.C. **Cognitive Maps In Rats And Men.** 1948. *Psychological Review.* 55(4), 189–208.
- Tomohisa, T. and F.H Gage. 2018. **Review: Adult Neurogenesis Contributes To Hippocampal Plasticity.** *Cell Tissue Res.* 373(3):693-709. doi: 10.1007/s00441-017-2735-4.
- Trivino-Paredes, J., A.R. Patten., J. Gil-Mohapel., and B.R. Christie. 2016. **The Effects Of Hormones And Physical Exercise On Hippocampal Structural Plasticity.** *Frontiers in Neuroendocrinology.* 41, 23–43. doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.03.001
- UICN. 2009. IUCN. **Red List Of Threatened Species.** Versión 2009.1. www.iucnredlist.org. Fecha de consulta 30 de septiembre de 2009.
- Van Rhijn, F.A., and J.C. Van Gorkom. 1983. **Optic Orientation In Hatchlings Of The Sea Turtle, Chelonia Mydas. III. Sea-Finding Behaviour: The Role Of Photic And Visual Orientation In Animals Walking On The Spot Under Laboratory Conditions.** *Marine Behaviour and Physiology.* 9(3):211-228. doi:10.1080/10236248309378594
- Wallace, B.P. A. DiMatteo., B.J. Hurley., E.M. Finkbeiner., A.B. Bolten., M.Y. Chaloupka., B.J Hutchinson., A. Abreu-Grobois., D. Amorocho., K.A. Bjorndal., J. Bourjea., B.W. Bowen., R.B. Dueñas., P. Casale., B.C. Choudhury., A. Costa., P.H. Dutton., A. Fallabrino., A. Girard., M. Girondot., M.H. Godfrey., M. Hamann., M. López-Mendilaharsu., M.A Marcovaldi., J.A. Mortimer., J.A. Musick., R. Nel., N.J. Pilcher., J.A. Seminoff., S. Troëng., B. Witherington., and R.B. Mast.2010. **Regional Management Units For Marine Turtles: A Novel Framework For Prioritizing Conservation And Research Across Multiple Scales.** PLoS ONE 5(12):e15465. doi: 10.1371/journal.pone.0015465

Weinstock, M. 1997. **Does Prenatal Stress Impair Coping And Regulation Of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis.** *Neurosci Biobehav Rev.* 21(1):1-10. doi: 10.1016/s0149-1

Xavier, H., S.D. Whiting., G. Enever., K. Lambert., M.A. Hindell., and C.R. McMahon. 2016. **Nesting Ecology Of Hawksbill Turtles At A Rookery Of International Significance In Australia's Northern Territory.** *Wildlife Research.* 43(6), 461-473. doi.org/10.1071/WR16047

A N E X O

Estrés, Neurogénesis Y Tortugas Marinas

Publicado en: *Milenaria, Ciencia y Arte* (2018). 8(13): 19-21

Estrés, neurogénesis y tortugas marinas

Nancy Marisol Unda Díaz y Alma Lilia Fuentes Farías

Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA)-UMSNH. Morelia, Michoacán, México.
Contacto: nancy.ma.diaz2602@gmail.com

Resumen: El estrés se define como una respuesta fisiológica a un estímulo que el organismo percibe como amenazante. En la naturaleza hay diferentes condiciones en que los animales se encuentran sometidos a estrés, como lo es el estar en posibilidad constante de ser depredado, la disponibilidad de alimento que a lo largo del año puede variar por cuestiones climáticas, o por las condiciones de conservación del entorno, el proceso de reproducción que implica competencia y el desarrollo que involucra retos fisiológicos constantes, que dependen en gran medida de todo lo anterior. Las tortugas marinas son un ejemplo de una población animal sometida a estrés principalmente por la actividad antropogénica. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UINC) considera a las 8 especies existentes de tortugas marinas como amenazadas o en peligro de extinción. Es por ello que durante décadas, se han implementado estrategias de conservación, siendo una de las principales la creación de viveros para la incubación de los huevos en nidos artificiales, es decir hechos por el hombre. Al respecto se ha especulado que la manipulación, rotación o vibración, a la que son sujetos los huevos durante su traslado, así como el ambiente de incubación artificial induce estrés crónico embrionario, que pudiera afectar de manera negativa el desarrollo del organismo. Existe evidencia de que el estrés crónico embrionario tiene efectos negativos a nivel fisiológico en los organismos, entre ellos, en los niveles de la hormona indicadora de estrés (conocida como, corticosterona, en reptiles), así como en la morfología de las neuronas de diferentes áreas del cerebro que presentan retraso en su desarrollo.

Palabras clave: Tortugas marinas, vivero, corticosterona.

Estrés

¿Cuántas veces has escuchado la palabra estrés? ¿Te suena familiar? Estrés es una palabra que cotidianamente se usa. Se escucha tanto en el trabajo como en la escuela y hospitales. Es muy común oír hablar de estrés, de hecho se considera una enfermedad de la sociedad moderna. Te has preguntado ¿si los animales silvestres lo sufren? Antes de continuar preguntémosnos ¿Qué es el estrés? ¿Para qué sirve? y ¿Realmente es como piensa la mayoría, por entero negativo?

El estrés ¿amigo o enemigo?

Un investigador llamado Selye en 1936 define al estrés como un factor de alarma, en donde el individuo presenta cambios conductuales y fisiológicos (a nivel hormonal y sistema nervioso central) para poder responder de una manera más adecuada hacia él estresor que comúnmente se define como una amenaza. El protagonista de la respuesta neuroendócrina al estrés es

el eje Hipotálamo, hipófisis o pituitaria, adrenal (HPA). ¿Cómo funciona este mecanismo? El organismo al detectar un evento amenazante genera por parte del hipotálamo un aumento en la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP). La presencia de estas sustancias, estimula a la hipófisis para que libere la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a la circulación general del cuerpo. Esta actúa sobre la corteza de las glándulas adrenales o suprarrenales induciendo la síntesis y la liberación de glucocorticoides (Fig1.), cortisol en mamíferos o corticosterona en reptiles. Esta hormona actúa en diferentes órganos teniendo una función específica. El eje HPA en reptiles es similar a la descrita en otros vertebrados (Linch, 1995), incluye elementos similares como la liberación de la CRH, el cuál es un elemento clave del eje HPA presente en el cerebro de tortugas (Bugnon *et al.*, 1984) el cual es similar al de los mamíferos. Las neuronas

Camacho, I; Rodríguez, J; Oswaldo, E; Rodríguez, M; & Musalem, C. (2015). Prevalencia de obesidad en preescolares, escolares y adolescentes en el Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos del ISSSTE. Revista Especialidad Médica Quirúrgica. 20(2), 152-157. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2015/rmq152e.pdf>

El Heraldo de Saltillo, (2015). ¿Gorditos o enfermos?, la obesidad infantil en México. Recuperado de <http://www.elheraldodesaltillo.mx/2015/12/16/gorditos-o-enfermos-la-obesidad-infantil-en-mexico/> García, P; Noyola, P; Hernández, M & Peralta, J. (2017). Orientación nutricional sobre el consumo adecuado de bebidas en escolares. Revista de Salud Pública y Nutrición. 16(2), 19-27. Disponible en: <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/30>

Gómez, S. (2016). Prevalencia, determinantes y prevención de la obesidad infantil. Tesis Doctoral. 1-154. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/403607>

Jaimovich, S; Campos, C; Bustos, J; Campos, M; Lillo, V & Herrera, L. (2015). Efectos de una intervención on line en conductas de autocuidado asociadas a la alimentación. Enfermería global. 14(3), 72-83. Disponible en: <http://revistas.um.es/eglobal/article/view/206301/177201>

Mussini, M & Temporelli, K. (2013). Obesidad: un desafío para las políticas públicas. Estudios sociales. 21(41), 166-184. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/estsoc/v21n41/v21n41a7.pdf>

Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño. México, DF. Diario Oficial de la Federación. Disponible: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/031ssa29.html>

Organización Mundial de la Salud. (2017). Datos y cifras sobre obesidad infantil. Nota descriptiva. [Internet]. [Citado 15 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/es/>

Ortega, D; Noguera, J; & Aguilar, H. (2016). Diseño de intervención conductual para mejorar hábitos alimenticios y actividades físicas en niños de edad escolar con obesidad. Jóvenes en la ciencia. 2(1), 85-89. Disponible en: <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/1004/643>

Ortega-Cortés, R. (2013). Costos económicos de la obesidad infantil y sus consecuencias. Revista Médica Instituto Mexicano Seguro Social. 52(1), S8-S11. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/4577/457745485003/>

Tarazona, M; Rosas, J; Salazar, J; Lozano, A., & Wilches, G. (2017). Factores de riesgo de sobrepeso y obesidad infantil en escolares de tres instituciones educativas de Cúcuta. Revista Inbiom. 4(1), 45-51. Disponible en: http://ojs.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/INBIOM/article/view/2416/1296

UNICEF & LeMoyne, (2018). El hambre y la obesidad en América Latina, dos caras de la misma moneda. Recuperado de <http://www.onunoticias.mx/el-hambre-y-la-obesidad-en-america-latina-dos-caras-de-la-misma-moneda/>

Visiedo, A; Sainz, P; Crone, D; Aznar, S; Pérez, F; Sánchez, R; Velázquez, F; Berná, J & Zamora, Z. (2016). Programas para la prevención de la obesidad en escolares de 5 a 10 años: revisión de la literatura. Nutrición Hospitalaria. 33(4), 814-824. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.375>

paraventriculares presentan terminales en la hipófisis que responde a la liberación de ACTH (Mancera *et al.*, 1991), lo cual se ha descrito en la adenohipófisis del lagarto *Cnemidophorus lemniscatus* (Del Conte, 1980).

Todo el proceso anterior descrito, en conjunto acelera el ritmo cardiaco, la respiración y aumenta la glucosa en todo el cuerpo con el fin de tener la suficiente energía para huir, escapar o ponerse a salvo. De esta forma el estrés, es considerado como amigo, es un proceso fundamental de supervivencia. Prepara al organismo para dar una respuesta adecuada a cualquier cambio que se perciba, como evento inusual o amenazante. El estrés ha sido un factor importante durante la evolución, ha permitido que especies de animales incluyendo la nuestra hayan sobrevivido; es por ello que Selye (1936), menciona que un poco de estrés es saludable. Pero ¿qué pasa cuando el estrés sobrepasa los límites adaptativos? ¿qué pasa cuando durante meses o años se está sometido a angustia o peligro?

El enemigo y los animales silvestres

Si bien el efecto del estrés en los animales domésticos ha sido bien documentado, la severidad y el número de factores de estrés que afligen a los animales silvestres han sido subestimados. Te preguntarás si en verdad los animales sufren de estrés, e inmediatamente te vendrá a la mente ¡Claro, los animales en cautiverio! y sí, no te equivocas, las instalaciones en donde se encuentran es percibida como algo amenazante. Se sabe que los animales que se encuentran en cautiverio presentan mayor ansiedad e incluso muestran miedo. Pero ¿en la naturaleza?, lo más común es pensar que el único estrés al que están sometidos los animales es el que produce estar a merced del posible depredador. Sin embargo los animales

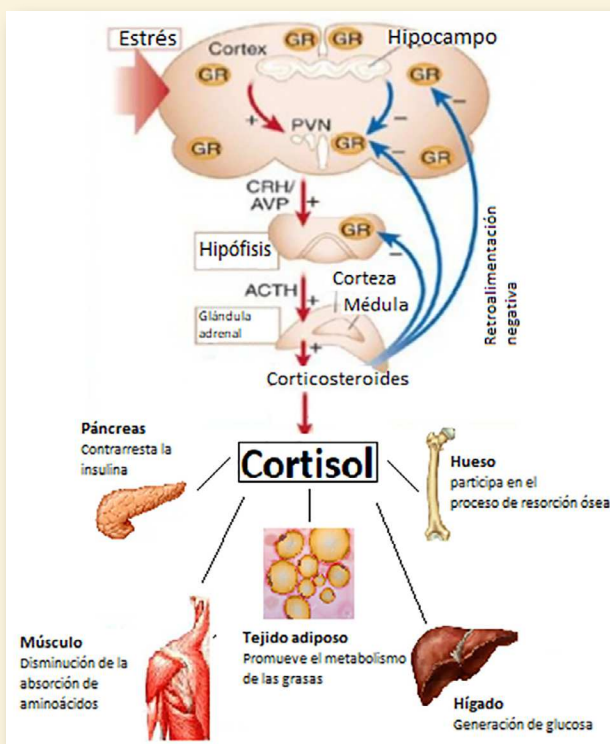


Fig. 1 Regulación del eje Hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA) de los glucocorticoides. El núcleo paraventricular hipotálamico (PVN) recibe información del hipotálamo sobre un estímulo y del hipocampo. El PVN libera hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP) en la circulación. CRH y AVP a través de la ruta vascular para acceder a la hipófisis, que responden con la liberación rápida de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). A su vez, la ACTH alcanza la corteza suprarrenal donde se activa la síntesis y secreción de hormonas glucocorticoides. Los glucocorticoides regulan la actividad del eje HPA, a través de la retroalimentación negativa actuando a nivel de la hipófisis donde inhiben la liberación de ACTH, y al nivel del PVN donde inhiben la liberación de CRH y AVP.

en su hábitat tienen que enfrentar circunstancias que suelen ser estresantes, como la competencia por alimento, competencia para reproducirse, enfermedades, etc. Sin embargo la causa principal es la perturbación del hombre en sus ambientes; que ha ocasionado pérdida de hábitat y contaminación en ellos, generando en los organismos presenten un estrés crónico, teniendo consecuencias muy negativas en las poblaciones.

De esto tenemos cierto grado de “conciencia” pero curiosamente hay ejemplos en donde al pretender proteger estamos dañando sin saberlo. En dicho contexto, el Laboratorio del Eco-fisiología Animal del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA) se encuentra realizando estudios sobre las prácticas de conservación de tortugas marinas y si estas medidas generan estrés en las tortugas.

¡Las tortugas marinas se estresan!

La práctica de conservación mayormente llevada a cabo, no solo en México sino a nivel mundial, consiste en identificar los nidos creados por las hembras (NN), también llamados nidos naturales y trasladarlos a nidos hechos por el hombre (NH) o artificiales en una área de playa protegida denominada vivero (Fig. 2). Durante este proceso los huevos son expuestos a movimientos de rotación o vibración causada por la manipulación afectando el desarrollo de los organismos negativamente (Limpus *et al.*, 1979; Sönmez *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos de los estudios que se están llevando a cabo en el INIRENA demuestran que los embriones de la tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) incubados en NH están sujetos a estrés crónico embrionario, ¿Las razones? El ambiente incubatorio del nido natural versus nido artificial parece ser muy diferente, es decir, al parecer la mano del hombre no ha podido semejar el nido que naturalmente la tortuga construye. Herrera-Vargas *et al.*, 2017, mostraron que efectivamente los embriones/fetos de tortugas incubadas en nidos de vivero sufren de estrés crónico embrionario con efectos negativos a corto y largo plazo en la salud de los individuos.

Otro aspecto que se ha abordado es el efecto del estrés crónico en el proceso de neurogénesis. La neurogénesis se define como el nacimiento y proliferación de neuronas nuevas en el cerebro (Lledo *et al.*, 2006). El estrés es un factor importante en la regulación de la neurogénesis. Se sabe que el estrés crónico puede ocasionar alteraciones en ciertos sistemas metabólicos, teniendo como consecuencia una disminución en la neurogénesis (Abush & Akirav, 2013). Se ha demostrado que la exposición a diferentes estímulos estresantes, como el olor de un depredador, un choque

eléctrico, la representación jerárquica en un grupo social, entre otros, disminuye la supervivencia de las nuevas células en el hipocampo (Dagyte *et al.*, 2009).

El proceso de neurogénesis es mucho más activo durante el desarrollo embrionario. Entonces, si ha sido demostrado que las tortugas golfinas incubadas en nidos hechos por el hombre presentan estrés durante su desarrollo, podríamos pensar que estas tortugas ¿presentan efectos negativos en el proceso de neurogénesis? La respuesta es sí. Nuestros estudios han demostrado que las tortugas que son incubadas en nidos hechos por el hombre presentan una disminución en el número de células nuevas en el cerebro (Fig3.).

El eje HPA en mamíferos y reptiles ha sido conservado durante la evolución y los mecanismos por los cuales es mediada su función fueron conservados a lo largo de su historia evolutiva (Ottaviani & Franceschi, 1998). Todo lo anterior en conjunto, nos lleva a concluir que las tortugas incubadas en NH serán tortugas que presentaran procesos de memoria y aprendizaje alterados (Bennett, 2008).

En conclusión, estos resultados sugieren que los huevos incubados de manera artificial son sometidos a estrés crónico durante su desarrollo, lo cual podría estar afectando al momento de la emergencia, incluso a lo largo de su vida. Por lo tanto la incubación artificial es una práctica que se debe de ejercer con mucho cuidado, teniendo en cuenta que la manera ideal de la incubación de los huevos sea de manera natural. Tomando en cuenta los efectos negativos de los viveros se deberán seguir realizando investigaciones, así como reforzar el manejo adecuado para la conservación de las tortugas marinas, no solo en México sino a nivel mundial.

Pues ahora ¡ya lo sabes!, Hay que cuidar el medio ambiente y a las poblaciones silvestres y ¡proteger!, pero de manera adecuada.

año 8, no. 13 julio - diciembre del 2018

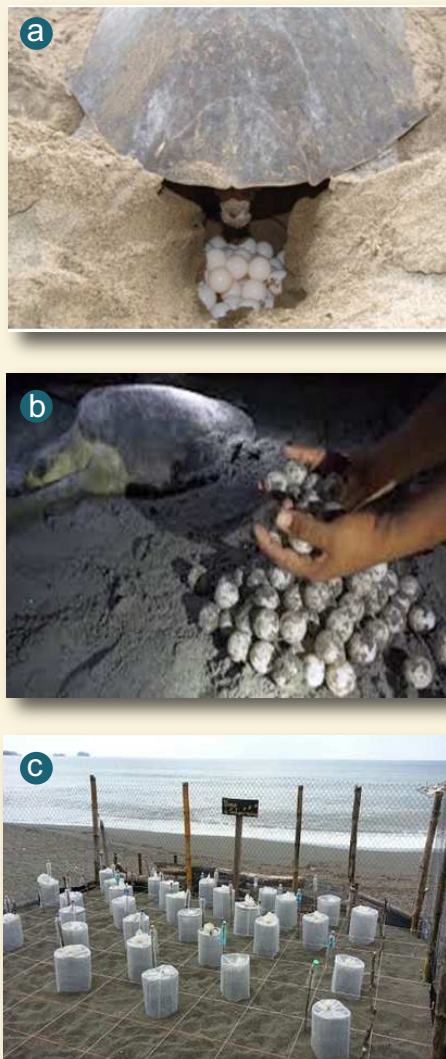


Fig. 2. Fotografía que muestra el desove de la tortuga marina (a), el traslado y manipulación de los huevos (b), huevos incubados en nidos hechos por el hombre (NH) en los viveros (c)

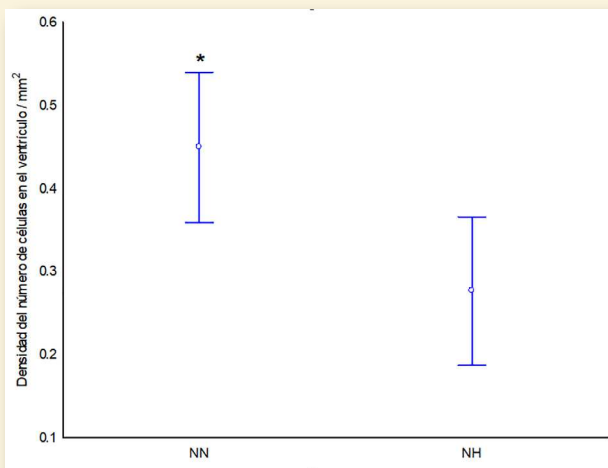


Fig. 3 Las tortugas incubadas en nidos hechos por el hombre (NH) presentan una menor densidad de células nuevas en el ventrículo lateral que las tortugas incubadas en nidos naturales (NN). La gráfica muestra el número de células nuevas generadas en el ventrículo lateral en NN y NH (ANOVA anidada $F(1,26) = 7.84, *p = 0.0095$).

Referencias

Abush H & I Akirav. (2013). Cannabinoids ameliorate impairments induced by chronic stress to synaptic plasticity and short-term memory. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1521-1534.

Bennett, A. O. M. (2008). Stress and anxiety in schizophrenia and depression: Glucocorticoids, corticotropin-releasing hormone and synapse regression. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 42(12), 995-1002.

Bugnon, C., Fellmann, D., Gouget, A., Bresson, J. L., Clavequin, M. C., Hadjiyiassemis, M., & Cardot, J. (1984). Corticoliberin neurons: Cytophysiology, phylogeny and ontogeny. *J. Steroid Biochem.*, 20, 183-195.

Dagyte, G., Van der Zee, E. A., Postema, F., Luiten, P. G., Den Boer J. A. & Trentani, A. (2009). Chronic but not acute foot-shock stress leads to temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus. *Neuroscience*, 162(4), 904-913.

Del Conte, E. (1980). Ultrastructure of the cell types of the anterior hypophysis in a lizard. I. Corticotrophs. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 69, 281-296.

Herrera-Vargas, Ma., A., Meléndez-Herrera, E., Gutiérrez-Ospina, G., Bucio-Piña, F. E., Báez-Saldaña, A., Siliceo-Cantero, H.H., & Fuentes-Farías, A.L. (2017). Hatchlings of the Marine Turtle *Lepidochelys olivacea* Display Signs of Prenatal Stress at Emergence after Being Incubated in ManMade Nests: A Preliminary Report. *Front. Mar. Sci.* 4:400.

Limpus, C., Valonna, B. & Miller, J. (1979). Movement induced mortality of loggerhead eggs. *Herpetologica*. 35:(4) 335-338.

Licht, P. (1995). Reproductive physiology of reptiles and amphibians. In E. F. Gibbons, Jr., B. S. Durrant, y J. Demarest (Eds.), "Conservation of Endangered Species in Captivity: An Interdisciplinary Approach" (pp. 169-186). Albany: State University of New York Press.

Lledo, P., M., Alonso, M. & Grubb, M., S. (2006). "Adult Neurogenesis and Functional Plasticity in Neuronal Circuits." *Nature reviews. Neuroscience* 7(3):179-93. Retrieved February 26, 2016.

Mancera, J. M., López Avalos, M. D., Pérez-Figares, J. M., & Fernández-Llrebz, P. (1991). The distribution of corticotropin-releasing factordimmunoreactive neurons and nerve fibers in the brain of the snake, *Natrix maura*. Coexistence with arginine vasotocin and mesotocin. *Cell Tissue Res.*, 264, 539-548.

Ottaviani, O., & Franceschi C. (1998). A new theory on the common evolutionary origin of natural immunity, inflammation and stress response: the invertebrate phagocytic immunocyte as an eye-witness. *Domestic Animal Endocrinology* 15(5): 291-296.

Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138, 32.

Sönmez B., Turan, C., & Özdilek, S. (2011). The effect of relocation on the morphology of Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), hatchlings on Samandag beach, Turkey (Reptilia: Cheloniidae) *Zoology* 52: 29-38.