

# R **espuesta neuronal a estímulos magnéticos en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*: Estudios Preliminares**

*Luis González Cárdenas<sup>1</sup>, Julieta Mendoza Torreblanca<sup>2</sup>, Esperanza-Meléndez-Herrera<sup>1</sup>,  
Gabriel Gutiérrez-Ospina<sup>2</sup>, Jaime Urrutia-Fucugauchi<sup>3</sup>, Raquel Martínez-Méndez<sup>2</sup>, Ma. Luisa  
García-Zepeda<sup>4</sup>, Ligia Pérez-Cruz<sup>3</sup> y Alma L. Fuentes-Farías<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio de Eco-fisiología Animal, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, UMSNH; <sup>2</sup>Laboratorio de Biología de Sistemas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; <sup>3</sup>Laboratorio de Paleomagnetismo, Instituto de Geofísica, UNAM; <sup>4</sup>Laboratorio de Paleontología, Facultad de Biología, UMSNH.

## Resumen

Numerosos estudios conductuales sugieren que la navegación en las tortugas marinas depende, en parte, de su capacidad para percibir la inclinación e intensidad del campo magnético terrestre. No obstante lo anterior, el sustrato neurofisiológico que subyace a la magnetocepción en estos organismos permanece desconocido. Por ello, en el presente trabajo identificamos áreas del cerebro que responden a cambios en la intensidad del campo magnético ambiental en crías de la especie *Lepidochelys olivacea*, utilizando la técnica de inmunohistoquímica para la detección de c-Fos, un factor de transcripción cuya disponibilidad se eleva de forma consecutiva a la activación neuronal. En concordancia con ello, el análisis morfológico cualitativo mostró una elevación de la marca para c-Fos en la corteza dorso-medial, el tecto óptico y la vertiente dorsal ventricular de crías estimuladas con un campo terrestre equivalente a las 40 $\mu$ T, al ser comparadas con aquellas mantenidas en un ambiente magnético

neutro (i.e., grupo control). De manera interesante, la intensidad de la marca para c-Fos en las regiones cerebrales descritas de crías sometidas a campos magnéticos ambientales equivalentes a  $100\mu\text{T}$  fue cualitativamente equivalente a la observada en los cerebros de las crías que constituyeron al grupo control. Así, estas observaciones apoyan que estructuras cerebrales uni y multisensoriales relacionadas también con la vía visual y la orientación espacial participan en el procesamiento de la información magnética ambiental. Los datos mostrados también sugieren que existe un rango de intensidades del campo magnético ambiental (alrededor del valor de  $40\mu\text{T}$ ) que el sistema magnetoceptivo identifica como significativo.

**Palabras clave:** Magnetocepción, proteína c-Fos, orientación, rango dinámico de percepción.

## Abstract

Neuronal response to magnetic stimulation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: Preliminary Studies. Numerous behavioral studies suggest that navigation in sea turtles depends in part on their ability to perceive the inclination and intensity of Earth's magnetic field. Nevertheless, the neurophysiological substrate underlying the magnetoception in these organisms remains unknown. Therefore, in this work we identified the brain areas that respond to changes in the intensity of the ambient magnetic field in *Lepidochelys olivacea* hatchlings using the immunohistochemical technique for detection of c-Fos, a transcription factor whose availability rises consecutively to neuronal activation. Consistent with this, the qualitative morphological analysis showed an elevated immunoreactivity for c-Fos in the dorso-medial cortex, the optic tectum and the dorsal ventricular ridge of hatchlings stimulated with an intensity equivalent to  $40\mu\text{T}$  when compared with those held in a neutral magnetic environment (i.e., control group). Interestingly, the intensity of the c-Fos mark in brain regions observed under an ambient magnetic field equivalent to  $100\mu\text{T}$  was equivalent to that observed in the brains of hatchlings that constituted the control group. Thus, these observations support that single and multi-sensory brain structures related to the visual pathway and spatial orientation are participating in the processing of the magnetic environment information. The displayed data also suggest the existence of a range of ambient magnetic field intensities (about  $40\mu\text{T}$  value) that the magnetoceptive system identifies as significant.

**Keywords:** Magnetoception, c-Fos protein, orientation, dynamic range of perception.

## Introducción

Es bien aceptado que las diferentes especies de animales poseen cinco sistemas sensoriales que aportan información visual, auditiva, olfativa, gustativa y somestésica al organismo. Existen, sin embargo, sistemas sensoriales tales como la electrocepción y la magnetocepción cuyas características fisiológicas aún esperan ser investigadas en detalle. Con

respecto a esta última, por ejemplo, se sabe que está presente en bacterias (Kirschvink et al., 2001), insectos (Avalos et al., 1999; Etheredge et al., 1999), peces (Mann et al., 1988), aves (Fleissner et al., 2003), tortugas marinas (Lohmann et al., 1999) y en algunos mamíferos (Nemec et al., 2001). En el caso particular de las tortugas marinas, la colocación de imanes en la cabeza o en el caparazón con intensidades de 85 o 350 mT en crías y de  $1170 \times 10^3$  mT en la cabeza de especímenes adultos conduce a la desorientación del desplazamiento del nido hacia el mar (Fuentes-Farías et al., 2011) o de las rutas de migración de las hembras adultas navegando en dirección de sus playas de nidación, respectivamente (Papi et al., 2006; Luschi et al., 2007).

Sin embargo, no obstante la abundante información conductual acumulada, poco sabemos sobre los mecanismos neurofisiológicos que subyacen las habilidades magnetoceptivas en las tortugas. Con base en los antecedentes, se podría suponer que existen ensamblajes de neuronas capaces de transducir y procesar información magnética ambiental. Así, para abordar esta hipótesis, en el presente trabajo identificamos mediante técnicas de mapeo funcional (Janknecht et al., 1995), los grupos neuronales cerebrales responsivos a cambios en la intensidad del campo magnético ambiental en crías de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

## Materiales y métodos

### Especímenes

Los experimentos fueron llevados a cabo en crías nacidas en el laboratorio provenientes de huevos colectados y transportados en nidos de vermiculita desde la playa La Escobilla ( $96^{\circ}27'16''$ W,  $15^{\circ}40'36''$ N), Oaxaca, México. Una vez en el laboratorio, un total de 10 huevos fueron incubados en un horno a  $33^{\circ}$ C hasta su eclosión. A esta temperatura se garantiza la feminización del embrión (e.g. Jiménez-Trejo et al., 2011). Al momento de su eclosión, las crías fueron mantenidas en un acuario marino alimentadas una vez al día hasta el día del experimento. Se prefirió llevar a cabo el estudio en hembras ya que estas muestran según estudios una filopatria a su playa natal mayormente significativa que en el caso de los machos (Lee et al., 2007). Tanto el diseño experimental como el manejo de las crías se apegaron a los lineamientos de las guías que para el uso y manejo de animales de laboratorio han publicado los Institutos Nacionales de Salud. La colecta y la experimentación fueron llevadas a cabo con autorización de la SEMARNAT (SGPA/DGVS/05170/07 y SGPA/DGVS/04011/08)

### Estimulación magnética de *Lepidochelys olivacea*

Cumplidos los tres días de vida, las crías de *L. olivacea* fueron transportadas a la Unidad de Paleomagnetismo ubicada en las instalaciones del Instituto de Geofísica de la Universidad Nacional Autónoma de México, para ser sometidas a los protocolos de

estimulación magnética. Para ello, las crías se dividieron en tres grupos denominados como “control” en el que los especímenes fueron sometidos a un campo magnético compensado con una intensidad equivalente a  $0\mu\text{T}$  (n3), “estimulados 40” en el que los especímenes fueron sometidos a pulsos de estímulos magnéticos de intensidad equivalente a  $40\mu\text{T}$  con una duración de 4 milisegundos aplicados en intervalos de 5 minutos durante 45 minutos (n3), y “estimulados 100” en el que los especímenes fueron estimulados siguiendo el protocolo anterior con la salvedad de que el valor de intensidad del campo magnético aplicado fue de  $100\mu\text{T}$  (n2). Los estímulos magnéticos fueron aplicados por medio del generador de pulsos IMPULSE MAGNETIZER PM9 en el que las crías fueron introducidas por una hora con quince minutos. Si bien los estímulos aplicados no necesariamente reflejan la forma en que se presentan en la naturaleza, estos protocolos fueron diseñados con base en aquellos utilizados para la exploración experimental de otros sistemas sensoriales (e.g., flashes de luz para el sistema visual; Kaczmarek y Chaudhuri, 1997) pues evitan la habituación de los receptores al estímulo.

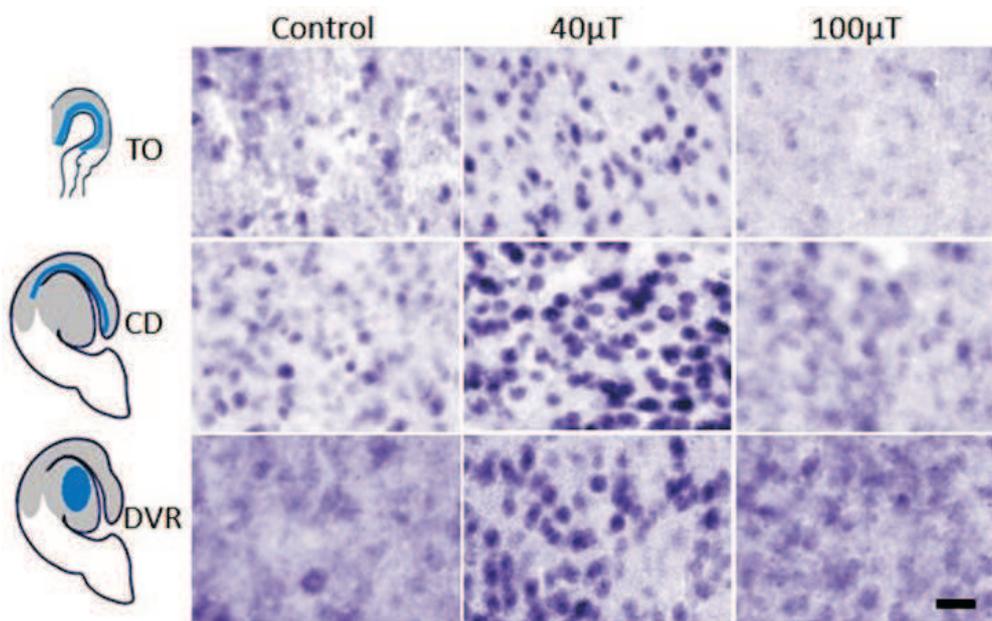
Por otro lado, se eligieron valores de intensidad para los estímulos magnéticos que corresponden al promedio aproximado de los valores característicos del área de nidación de *L. olivacea* ( $40\mu\text{T}$ ; geomag.models@noaa.gov) y que sobrepasan éstos ( $100\mu\text{T}$ ) bajo la lógica de que el sistema magnetoceptivo no debería responder a valores supra-umbrales pues probablemente salen del rango dinámico de respuesta del receptor.

Al terminar el experimento, las crías fueron anestesiadas y perfundidas vía cardíaca con una solución amortiguada de paraformaldehído (4%). Los cerebros fueron subsecuentemente postfijados en la misma solución fijadora por 24 horas y transferidos a una solución crioprotectora (20%) por 24 horas para luego ser montados en el compuesto OCT y congelados en 2-metil butano pre-enfriado con hielo seco a  $-45^{\circ}\text{C}$  previo a su corte.

### **Inmunohistoquímica para c-Fos.**

Cortes coronales ( $50\mu\text{m}$ ) del cerebro fueron obtenidos en un criostato muestreando-se una sección cada  $100\mu\text{m}$ . Los cortes montados en laminillas gelatinizadas fueron re-hidratados con amortiguador de fosfatos (0.1M, pH 7.4; PB) e incubados en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PB adicionado con tritón X-100 (0.3%; PBT) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados, las laminillas fueron transferidas a lo largo de una serie de diluciones de etanol/PBT al 50%, 100%, 100%, 75%, 50%, 25% durante 5 minutos cada paso para deslipidizar al tejido. Después de un lavado en PB, los cortes fueron incubados con una solución de ácido cítrico (ImmunoRetriever, Bios) durante 60 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Hecho el desenmascaramiento antigénico, los cortes se lavaron en PBT y se incubaron con PBT adicionado con suero equino (5%; suero de bloqueo) por 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados, los cortes se incubaron con un suero policlonal obtenido en conejo y dirigido contra c-Fos sc52 (rabbit polyclonal igG, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:2500 en suero de bloqueo durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ ; el uso de este anticuerpo en tortugas ha sido validado previamente (Jiménez-Trejo et al., 2011). Después de tres lavados, los cortes fueron incubados con un suero secundario policlonal obtenido en cabra y diri-

gido contra inmunoglobulinas G de conejo acoplados a biotina (Chemicon) en una dilución 1:2500 en suero de bloqueo por 2 horas a temperatura ambiente. Al término de este periodo, los cortes se lavaron e incubaron con el complejo avidina-peroxidasa (ABC Kit, Vector Laboratories) durante una hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados, los cortes se incubaron con una solución de diaminobencidina (ABC staining kit, Vector Laboratories) durante 6 minutos a temperatura ambiente para revelar la ubicación de la actividad de la peroxidasa. La reacción de revelado fue detenida lavando abundantemente con PB. Entonces, las laminillas se dejaron secando a temperatura ambiente y se montaron con Cytoseal (Richard-Allan-Scientific). Una laminilla de cada grupo experimental fue utilizada como control negativo; en estas no se agregó el anticuerpo primario. Posterior a su montaje, el material histológico generado fue analizado bajo microscopía de campo claro (Leica DM3000) y las imágenes correspondientes al cerebro de cada grupo experimental fueron capturadas utilizando un sistema digital de procesamiento de imágenes manteniendo siempre los mismos niveles de ganancia, iluminación y contraste. Las áreas del cerebro que mostraron modificaciones en su inmunomarcaje para c-Fos fueron identificadas con base en el atlas del cerebro de la tortuga *Chrysemys picta picta* (Powers y Reiner, 1980).



**Figura 1.** Inmunocitoquímica para c-Fos en cerebro de crías de *L. olivacea* sometidas o no a estímulos magnéticos del tecto óptico (TO), la corteza dorsal (CD) y la vertiente dorsal ventricular (DVR) de los grupos control, estimulados con 40  $\mu$ T y 100  $\mu$ T de intensidad magnética. Nótese que la intensidad de la marca nuclear es mucho mayor en los especímenes estimulados con 40  $\mu$ T. Escala = 20 $\mu$ .

## Resultados

Los cerebros de las crías de *L. olivacea* sometidas a una estimulación de 40 $\mu$ T de intensidad del campo magnético ambiental mostraron un incremento cualitativo del inmunomarcaje para c-Fos en la capa celular de la corteza dorso-medial, la vertiente dorsal ventricular y el estrato gris periventricular (SGP) del tecto óptico al ser comparadas con sus contrapartes control (Figura 1). De forma por demás interesante, los cerebros de las crías sujetas a estimulación de 100 $\mu$ T de intensidad del campo magnético ambiental no mostraron diferencias cualitativas de la inmunotinción para c-Fos con relación al marcaje observado en el grupo control (Figura 1). En la figura 1 se muestran ejemplos de estructuras que no mostraron inmunomarcaje para c-Fos e imágenes de los controles negativos en los que se omitió la adición del anticuerpo primario.

## Discusión

Las tortugas marinas poseen la habilidad de percibir el campo magnético terrestre y utilizar esta información para orientar sus movimientos de desplazamiento en tierra y mar (Fuentes-Farías et al., 2011; Johnsen y Lohmann, 2005). Aún se desconocen, sin embargo, los detalles neurofisiológicos que sustentan a las habilidades magnetoceptivas de las tortugas. Por ello, en este trabajo se mapearon los ensambles de neuronas responsivas a estímulos magnéticos mediante la técnica de inmunohistoquímica para c-Fos. Los resultados obtenidos documentaron el incremento de la disponibilidad de este factor de transcripción en la corteza dorso-medial, el tecto óptico y la vertiente dorsal ventricular, áreas del cerebro de los vertebrados involucradas en el procesamiento de información visual y polimodal (Lunenburge et al., 2001) y en procesos de orientación y memoria espaciales y volición (Connors y Kriegstein, 1986; Krauzlis et al., 2004). Estos resultados concuerdan con aquellos reportados por Ochoa (2007) y Fuentes-Farías (2008) en la especie *Chelonia agassizii* en los que se reporta activación neuronal en las mismas zonas. Es importante destacar que el estrato gris central del tecto óptico en tortugas es equivalente a la capa gris intermedia en el colículo superior del topo, capa que se activa después de someter a estos organismos a protocolos de estimulación magnética (Nemec et al., 2001, 2005), lo que sugiere que al menos algunas estructuras del sistema magnetoceptivo pudiesen estar conservadas filogenéticamente.

Un hallazgo importante es que el incremento del inmunomarcaje para c-Fos fue notorio cuando las crías se sometieron a cambios de la intensidad del campo magnético circundante de 40T, pero no de 100T. En concordancia, la intensidad promedio del campo magnético terrestre en las áreas de anidación de *L. olivacea* es de 40T. Esto sugiere que el sistema magnetoceptivo de la tortuga posee un rango dinámico de respuestas parece restringirse a los valores de intensidad magnética del área geográfica en la que habitan.

En conclusión, los datos presentados sugieren que el tecto óptico, la corteza dorso-medial y la vertiente dorsal ventricular constituyen relevos sinápticos de la vía magnetoceptiva en las tortugas marinas. Como es el caso para otras modalidades sensoriales, la magnetoceptiva en tortugas marinas posee rangos de discriminación que deberán ser definidos en estudios subsecuentes.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Jesús Santos Ramírez por su apoyo técnico. También agradecemos a Alejandro Marmolejo por su asesoría profesional en el cuidado y manejo de los huevos de tortuga. Este trabajo fue financiado por el CONACyT (94312 y 82879) y CIC UMSNH (No.8.37). El presente trabajo fue autorizado por la SEMARNAT (Permisos SGPA/DGVS/05170/07 y SGPA/DGVS/04011/08).

### Referencias

- Avalos DE, Wajnberg, PS, Oliveira I, Leal, MF y MS Darci. 1999. Isolation of magnetic nanoparticles from *Pachycondyla marginata* ants. J. Exp. Biol. 202: 2687-2692.
- Connors BW and AF Kriegstein. 1966. Cellular Physiology of the Turtle Visual Cortex: Distinctive Properties of Pyramidal and Stellate Neurons. J. Neurosci. 6: 164-177
- Etheredge JA, Perez SM, Taylor OR y R Jander 1999. Monarch butterflies (*Danaus plexippus* L.) use a magnetic compass for navigation. Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 13845-13846.
- Fleissner G, Wiltchko WE, Holtkamp M, Hanzlik M, Winklhofer J, Fleissner G, y N Petersen. 2003. Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. J. Comp. Neurol. 458: 350-360.
- Fuentes-Farías AL. 2008. Magnetorecepción en *Chelonia agassizi*. Tesis de Doctorado. Instituto de Geofísica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 130pp.
- Fuentes-Farías AL, Gutiérrez-Ospina G, Meléndez Herrera E, Camarena-Ramírez V, Ochoa-Tovar G, Mendoza-Torreblanca J, Martínez-Méndez R, Urrutia-Fucugauchi J, Báez-Saldaña A y García Zepeda M L. 2011. Marine turtle hatchlings use multiple sensory cues to orient their crawling towards the sea: Biological and Conservation Policy Implications., Adv. Biosci. Biotech. 1: 47-51.
- Janknecht R, Cahill MA, y A Nordheim. 1995. Signal integration at the C-fos promoter. Carcinogenesis. 3: 443-450.
- Jiménez-Trejo F, Olivos-Cisneros L, Mendoza-Torreblanca J, Báez-Saldaña A, Padilla Cortés P, Díaz-Cintra S, Gutiérrez-Ospina G y AL Fuentes-Farías. 2010. Mapping tem-

- perature-responsive neurons in the central nervous system of nominal female embryos of the marine turtle *Lepidochelis olivacea*: Implications for temperature dependent sex determination. *Adv. Biosci. Biotech.* 1: 1-7
- Johnsen S y KJ Lohman. 2005. The physics and neurobiology of magnetoreception. . 6: 703-712.
- Jones G y MW Holderied. 2007. Bat echolocation calls: adaptation and convergent evolution. *Proc. R. Soc. B.* 274: 905–912.
- Kaczmarek L and A Chauduri. 1997. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res. Rev.* 23: 237-256.
- Krauzlis R Liston D y C Carello. 2004. Target selection and the superior colliculus: goals, choices and hypotheses. *Vision Res.* 44: 1445–51.
- Kirschvink JL, Walker M, Y CE Diebel. 2001. Magnetite based magnetoreception. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 462-467.
- Lee P.L., Luschi P., G.C. Hays. 2007. Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assignment methods. *Mol. Ecol.* 16:61-74.
- Lohmann KJ, Hester JT y CM. Lohmann. 1999. Long distance navigation in sea turtles. . *Ethol. Ecol. Evol.* 11: 1-23.
- Lohmann KJ. 2007. Sea turtles: navigating with magnetism. *Curr. Biol.* 17: 102-104.
- Lunenburger L, Kleiser R, Stuphorn V, Miller LE, KP Hoffmann. 2001. A possible role of the superior colliculus in eye–hand coordination. *Prog. Brain. Res.* 134: 109–25.
- Luschi P, Benhamou S, Girard C, Ciccione S, Roos D, Sudre J and S Benvenuti. 2007. Marine Turtles Use Geomagnetic Cues during Open-Sea Homing. *Curr. Biol.* 17: 126–133,
- Mann S, Sparks HC, Walker MM y JL Kirschvink. 1988. Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *J. Exp. Biol.* 140: 35-49.
- Nemec P, Altmann J, Marhold S, Burda H, y HA Oelschlager. 2001. Neuroanatomy of Magnetoreception: The Superior Colliculus Involved in Magnetic Orientation in a Mammal. *Science* 294: 366-368.
- Nemec P, Burda H y HH Oelschläger . 2005. Towards the neuronal basis of magnetoreception a neuroanatomical approach. *Naturwissenschaften* 92: 151-157.
- Ochoa TM. 2007. Mapeo de ensamblajes neuronales asociados a la conducta de orientación y desplazamiento de las crías de Tortuga Negra *Chelonia agassizii* recién eclosionadas en la playa de Colola, Aquila, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. Mich. Mex. 41pp.
- Papi F, Luschi P, Akesson S, Capogrossi S and GC Hays. 2006. Open-sea migration of magnetically disturbed sea turtles. *J. Exp. Biol.* 203: 3435–3443

Perry RJ y PA McNaughton. 1991. Response properties of cones from the retina of the tiger salamander. *J. Physiol.* 433: 561-587.

Powers AS y A Reiner. 1980. A stereotaxic atlas of the forebrain and midbrain of the Eastern painted turtle (*Chrysemys picta picta*). *J. Hirnforsch.* 21:125-159.