Indicadores de estrés oxidativo hemático como biomarcadores de recuperación en tortugas bobas (*Caretta caretta)* varadas en aguas del Archipiélago Canario.

Indicators of blood oxidative stress as biomarkers of recovery in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in Canary Islands seawaters.

Ester Miriam García Pastor

Máster en Biología Marina: Biodiversidad y Conservación

Julio 2015

© UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Universidad de La Laguna

MARIO L. DÍAZ GONZÁLEZ , catedrático del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna y TOMÁS GÓMEZ SOUTULLO, Profesor Titular del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna

CERTIFICAN:

Que la memoria presentada por la Licenciada en Biología, titulada "Indicadores de estrés oxidativo hemático como biomarcadores de recuperación, en tortugas bobas (*Caretta caretta),* varadas en aguas del Archipiélago Canario.", ha sido realizada bajo nuestra dirección y consideramos que reúne todas las condiciones de calidad y rigor científico requeridas para optar a su presentación como Trabajo de Fin de Máster, en el Máster de Biología Marina: Biodiversidad y Conservación de la Universidad de La Laguna, curso 2013-2015.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en

San Cristóbal de La Laguna, a 10 de julio de 2015

Fdo. Dr. Mario Díaz

Fdo. Dr. Tomás Gómez

ÍNDICE

Introducción 1

Objetivos 5

Material y métodos 6

1. Ejemplares de *Caretta caretta* 6

1.1 Clasificación de ejemplares para su estudio 8

1.1.1 Ejemplares control 8

1.1.2. Ejemplares recuperados. 8

2. Obtención de muestras de sangre 9

3. Ensayos enzimáticos 10

3.1 Determinación de la actividad SOD. 10

3.1.1 Puesta a punto del ensayo. 11

3.1.2 Ensayo de la actividad SOD. 12

3.2 Ensayo enzimático de la actividad CAT. 13

3.3 Ensayo enzimático de la actividad GST. 14

4. Determinación de la proteína 15

5. Análisis de datos. 15

Resultados y discusión 16

1. Animales control. 16

1.1 Hematocrito (HTC) en sangre 16

1.2 Medición de proteína en muestra de animales control. 17

1.3 SOD extracelular (SOD EC) y SOD intracelular (SOD HTC) 18

1.4 CAT extracelular (CAT EC) y CAT intracelular (CAT HTC) 19

1.5 GST extracelular (GST EC) y GST intracelular (GST HTC) 21

2. Adaptaciones en el proceso de recuperación. 22

2.1 Hematocrito. 22

2.2 Actividad antioxidante 24

2.2.1 Superóxido dismutasa. 24

2.2.2 Superóxido dismutasa extracelular (SOD EC) 25

2.2.3 Superóxido dismutasa intracelular (SOD HTC) 25

2.2.4 Catalasa 26

2.3 Enzimas detoxificantes: GST **27**

2.3.1 GST extracelular (GST EC) **27**

2.3.2 GST intracelular (GST HTC) **28**

2.3.3 Medición de proteína en muestras de plasma y hematocrito de animales recuperados. **29**

Conclusiones **30**

Agradecimientos **31**

Bibliografía **32**

RESUMEN

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) es un componente importante de la respuesta de los organismos marinos expuestos a una variedad de estresores medioambientales, incluida la contaminación marina. El conocimiento de los niveles de actividad enzimática antioxidante y la capacidad de recuperación frente al estrés oxidativo en *Caretta caretta* pueden suponer una valiosa herramienta para la conservación de esta especie y de su hábitat. Para ello, mediante una metodología de análisis sencilla y poco invasiva para el animal, como son las muestras de sangre, y utilizando técnicas espectrofotométricas para medir las actividades de las principales enzimas implicadas en la lucha contra el estrés oxidativo, hemos querido establecer unos parámetros de referencia para animales control, clínicamente sanos. Además, hemos podido evaluar los cambios en estos parámetros en animales varados y posteriormente tratados en el centro de recuperación, en el momento de su ingreso y justo antes de su devolución al medio. Hemos encontrado que, los valores del hematocrito, las actividades superóxido dismutasa extracelular (SOD EC) y glutatión-*S*-transferasa extracelular (GST EC), parecen ser los biomarcadores más sensibles a las condiciones de estrés en ejemplares de *C. caretta*.

Palabras clave: estrés oxidativo, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-*S*-transferasa, *Caretta caretta*, biomarcadores.

SUMMARY

The production of reactive oxygen species (ROS) is an important component of the response of marine organisms exposed to a variety of environmental stressors, including marine contamination. Knowing the levels of enzyme activity and antioxidant resilience against oxidative stress in *Caretta caretta* could provide a valuable tool for the conservation of this species and its habitat. Here, by using a simple and non-invasive methodology, as is the blood sample, and using spectrophotometric techniques to measure the activities of the main enzymes involved in the antioxidant defence against oxidative stress we wanted to establish, in clinically healthy animals, a set of parameters as biomarkers and their normal ranges in control animals. Further, we have been able to assess the sort of variations in these parameters in stranded animals and treated in the recovery center at admission and just before its return to the environment. We have found that, besides haematocrit, enzyme activities of extracellular superoxide dismutase (SOD EC) and extracellular glutathione-*S*-transferase (GST EC), appear to be the most sensitive biomarkers for stress conditions in specimens of *C. caretta*

Key words: oxidative stress, superoxide dismutase, catalase, glutathione-*S*-transferase, *Caretta caretta*, biomarkers.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen siete especies de tortugas marinas en el mundo. De todas ellas hay poblaciones que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción. Esto es debido, principalmente, a causas antropogénicas: destrucción del hábitat, pesca accidental, contaminación marina y explotación directa sobre tortugas adultas o huevos para el consumo humano (Marco et al., 2009).

La tortuga boba, *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), es la tortuga marina más común en las aguas españolas y especialmente abundante en las aguas de Canarias. Las tortugas bobas que están presentes en las costas de Canarias son en su mayoría provenientes de la población del sur de Florida (44-78%) y el resto del Noroeste de Florida-Carolina del Norte (7-26%), Cabo Verde (6-17%) y México (2-9%) (Monzón-Argüello et al., 2009). Todos los individuos censados corresponden a hembras de juveniles subadultos (Bjondal et al., 2000), en época de crecimiento y engorde, que se están preparando para su migración hacia el Atlántico occidental donde tienen su zona de anidamiento (Carmiñas, 2004).

En las principales zonas de anidación de origen de las tortugas españolas, la abundancia de hembras adultas se está viendo reducida de forma severa en los últimos años (Mast y Pritchard, 2006). Esto ha convertido a la tortuga boba del Atlántico en una de las 10 metapoblaciones de esta especie más amenazadas del mundo, siendo su estatus de conservación "**En Peligro**" dentro de la categoría mundial y española de la UICN (Carmiñas, 2004).

Específicamente las tortugas marinas, debido a su longevidad, movimientos migratorios y a su posición en la cadena alimentaria, han sido definidas como buenos bioindicadores de calidad ambiental de los ecosistemas marinos (Keller et al., 2004; Lazar et al., 2011).

Dentro de los factores de amenaza antes enumerados, son especialmente relevantes las altas concentraciones de metales pesados y los enmalles con artes de pesca dentro de las aguas Canarias (Marco et al., 2009) (Fig. 1).

Fig. 1. Ejemplares de tortuga boba recogidos por el CRFS "La Tahonilla". Fotografía 1: Tortuga boba con un anzuelo de pesca alojado en el esófago. Fotografía 2: Tortuga boba enmallada en rafia proveniente de barcos de pesca. Fotografía 3: Tortuga boba afectada por un vertido de fuel.

Los efectos de los contaminantes químicos pueden afectar en diferentes niveles de la organización biológica de los animales marinos, siendo la respuesta bioquímica la primera línea de defensa para las células expuestas a dichos contaminantes. La interacción de los tóxicos con las dianas moleculares genera una cascada de reacciones bioquímicas en el intento de eliminarlos de las células o defenderlas frente a los efectos adversos (Stegeman et al., 1992a).

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el interior celular es un componente importante de la respuesta de los organismos marinos expuestos a una gran variedad de estresores medioambientales, incluida la polución marina (Lesser, 2006). El aumento de la producción de ROS inducido por estresores exógenos puede romper el equilibrio del sistema antioxidante genérico de la célula, produciendo daños severos en lípidos, proteínas y ADN.

Las enzimas antioxidantes implicadas en la lucha contra el daño producido por ROS son la superóxido dismutasa (**SOD**) y la catalasa (**CAT**), que representan la primera línea de defensa,

y la glutatión-S transferasa (**GST**) como una de las enzimas principales englobadas en el grupo de las detoxificantes.

La SOD cataliza la conversión del anión superóxido (O^{2-}) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) (Halliwell, 1982).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Existen diferentes isoformas de SOD: dos intracelulares y una extracelular. De forma intracelular encontramos la CuZn-SOD o SOD1 en citoplasma y núcleo, y la Mn-SOD o SOD2 en mitocondrias. La tercera isoforma, SOD-EC o SOD3, se encuentra predominantemente en la matriz extracelular de diferentes tejidos así como en el líquido intersticial incluyendo el plasma (Marklund, 1984).

Por su parte, la enzima CAT actúa reduciendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a oxigeno molecular (O_2) y agua (Chance et al., 1979; Claiborne, 1985).

$$H_2O_2 + O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

CAT se localiza a nivel celular en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos donde se encuentra en el citosol (Chance y Maehly, 1955).

La GST está englobada dentro del grupo de enzimas consideradas detoxificantes de fase II; actúa en la detoxificación de electrófilos tanto exógenos como endógenos que son productos del estrés oxidativo (Blanchette et al., 2007). En el proceso, el tripéptido glutatión se convierte en su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG). En las células, el glutatión se encuentra principalmente en su estado reducido (GSH) y, en mucha menor proporción, en su estado oxidado. La GST está presente en el citosol, microsomas y mitocondrias, y es necesaria para la desintoxicación de metales pesados presentes en el organismo.

Estas enzimas pueden ser utilizadas como biomarcadores fisiológicos. Tienen la ventaja de ser los primeros en poder ser detectados y ser la primera y más rápida respuesta a los cambios ambientales, pudiendo reflejar posibles efectos adicionales que se manifestarían posteriormente en una escala macroscópica en el organismo afectado (Mayer et al., 1992; Stegeman et al., 1992b).

El análisis de los indicadores de estrés oxidativo es una valiosa herramienta en la evaluación de la salud ambiental de especies amenazadas y por tanto una gran ayuda para la mejora de la conservación de dichas especies.

La vida eminentemente pelágica de los individuos de *C. caretta* hace especialmente difícil la obtención de muestras para su estudio y la existencia de centros de recuperación de fauna, que hacen de receptores de individuos varados o auxiliados por embarcaciones, facilita mucho la obtención de dichas muestras y son una herramienta inigualable al servicio de la conservación de esta especie. Además, estos centros nos permiten hacer estudios detallados de la capacidad de recuperación del organismo al encontrarse éste en un ambiente controlado y libre de los factores de amenaza.

A pesar de la relevancia de las aguas canarias como hábitat de tortugas marinas y la necesidad de conservación de dichos hábitats, los datos existentes de indicadores de estrés oxidativo en tortugas son muy escasos (Hermes-Lima y Storey, 1993; Willmore y Storey, 1997b), y todos los datos de contaminantes en dichos animales proceden de tortugas marinas varadas muertas. (Monagas et al., 2008; Oros et al., 2009; Torrent et al., 2004).

El Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS) “La Tahonilla”, situado en la Isla de Tenerife, registra aproximadamente unos 70-120 ingresos de *C. caretta* durante los meses comprendidos entre abril y octubre. Teniendo en cuenta que estudios recientes han demostrado la utilidad de la obtención de muestras sanguíneas como método no letal para el monitoreo de contaminantes ambientales en estos reptiles (Keller et al., 2004), esta situación supone una gran oportunidad para realizar este estudio.

Además, para la mayoría de contaminantes medioambientales se ha demostrado la existencia de una correlación entre los niveles cuantificados en sangre y tejidos, sugiriéndose que las muestras sanguíneas permiten establecer buenas estimaciones del nivel de contaminación en tortugas marinas (Keller et al., 2004; Lazar et al., 2011).

Dado que la contaminación marina es uno de los principales factores de amenaza para esta especie y que es uno de los agentes desencadenantes de la producción de ROS, el conocimiento de los niveles de actividad enzimática anti-ROS y la capacidad de recuperación frente al estrés oxidativo en estos animales puede suponer una valiosa herramienta para la conservación de la especie y su hábitat, utilizando una metodología de análisis sencilla y no letal para el animal; así como permitir la optimización de los tiempos de estancia dentro de los CRFS.

OBJETIVOS

1. Caracterización de distintos parámetros relacionados con el estatus hemático y de defensa antioxidante en tortugas control, diagnosticadas como clínicamente sanas.
2. Evaluación de los cambios en el estatus hemático y de defensa antioxidante, en animales varados y tratados en el centro de recuperación en el momento del ingreso y justo antes de su devolución al medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ejemplares de *Caretta caretta*.

En el presente estudio se han empleado muestras procedentes de 12 ejemplares hembra de tortuga boba, *Caretta caretta*, varados en la costa de la Isla de Tenerife durante los meses de julio, agosto y septiembre de 2014. Todos los animales muestreados ingresaron previamente en el CRFS "La Tahonilla" (Tenerife).

Una vez llegadas al centro fueron limpiadas de parásitos y algas e introducidas en tanques individuales de agua dulce para una desparasitación más eficiente. Además se les asignó un código de entrada que fue posteriormente vinculado a una historia clínica y a un número de microchip que se le implantó el día de su liberación. Para identificar cada ejemplar en el desarrollo de este estudio se utilizó el código de historia clínica asignado a cada animal.

Fig. 2: Ejemplar de *Caretta caretta* llegado al centro por enmalle con red de pesca. Aleta delantera izquierda necrosada por falta de circulación sanguínea.

La mayor parte de las tortugas ingresaron por problemas de enmalle en redes de pesca (n=8) (Fig. 2), y el resto por diversas causas como ingestión de plásticos y problemas de flotabilidad que derivaron en agotamiento y debilidad (n=4) (Tabla 1).

TORTUGA	DIAGNÓSTICO	TRATAMIENTO
3291	Enmalle con arte de pesca	Amputación de la aleta delantera derecha. Tratamiento con antibióticos 5 días post- amputación
3456	Enmalle con arte de pesca	Limpieza de las heridas y masaje en la zona para recuperar el riego sanguíneo
3457	Enmalle con arte de pesca	Limpieza de las heridas y masaje en la zona para recuperar el riego sanguíneo
3565	Enmalle con arte de pesca	Amputación de la aleta delantera izquierda. Tratamiento con antibióticos 5 días post- amputación
3605	Enmalle con arte de pesca	Limpieza de las heridas y masaje en la zona para recuperar el riego sanguíneo
3410	Debilidad y agotamiento por problemas con la flotabilidad. (Ingesta de plásticos)	Aplicación de enemas para facilitar la evacuación de los plásticos ingeridos. Alimentación enriquecida.
3426	Debilidad y agotamiento por problemas con la flotabilidad. (Ingesta de plásticos) Herida en el cuello por enmalle	Aplicación de enemas para facilitar la evacuación de los plásticos ingeridos. Alimentación enriquecida. Limpieza de las heridas y masaje en la zona para recuperar el riego sanguíneo
3340	Problemas con la flotabilidad. (Ingesta de plásticos) Caparazón roto por hélice de embarcación. (Entra con cicatrización parcial de la herida)	Aplicación de enemas para facilitar la evacuación de los plásticos ingeridos. Alimentación enriquecida. Limpieza de la herida del caparazón y eliminación de tejido muerto. Sometido a pruebas de estrés en buceo.
3432	Enmalle con arte de pesca	Limpieza de las heridas y masaje en la zona para recuperar el riego sanguíneo
3433	Enmalle con arte de pesca	Limpieza de las heridas y masaje en la zona para recuperar el riego sanguíneo
3447	Enmalle con arte de pesca	Aleta delantera izquierda necrosada. Limpieza de las heridas y masaje en la zona para recuperar el riego sanguíneo. Pierde parte de la aleta pero no hay que amputar.
3405	Debilidad y agotamiento por problemas con la flotabilidad. (Ingesta de plásticos) Heridas y pérdida de placas..	Aplicación de enemas para facilitar la evacuación de los plásticos ingeridos. Alimentación enriquecida. Limpieza de las heridas y eliminación de tejido muerto.

Tabla 1: Ejemplares utilizados en el estudio, diagnóstico y tratamiento utilizado.

A todas las tortugas se les tomó medida de longitud curva del caparazón (LCC), longitud recta del caparazón (LRC) y peso. En función de estas variables, los ejemplares fueron clasificados como juveniles subadultos según la clasificación de Bjondal, que establece el punto de corte en 64 cm (Bjondal et al., 2000) (Tabla 2).

TORTUGA	LCC (cm)	LRC (cm)	PESO (Kg)
3291	50	45	17
3456	50	47	14
3457	37	33,5	8,5
3565	52	47	16,3
3605	34	30	4,2
3410	38	35,8	7,3
3426	40	37	10,3
3340	45	41	11,5
3432	57	52	19
3433	31	29	5,6
3447	34	31	4,6
3405	39	36	9,7

Tabla 2: Relación de medidas y pesos de los ejemplares utilizados en este estudio.

1.1 Clasificación de los ejemplares para su estudio.

1.1.1 Ejemplares control.

Se han considerado animales control aquellos ejemplares que, próximos a su liberación, se diagnosticaron como animales sanos con unas condiciones cercanas a las de ejemplares salvajes. A éstos se les tomó muestra de sangre únicamente a la salida del centro.

1.1.2 Ejemplares recuperados.

Para desarrollar nuestro trabajo hemos considerado animales recuperados a aquellos en los que fue posible medir su adaptación en el proceso de recuperación, tomándoles muestra de sangre en el momento de su llegada y salida del centro.

2. Obtención de muestras de sangre.

A cada ejemplar de tortuga se le extrajo sangre dentro de los dos primeros días de su llegada al centro y de los dos días previos a su liberación, exceptuando los ejemplares que iban a ser tomados como controles, a los que sólo se les extrajo sangre a la salida del centro (Tabla 3).

La obtención de muestras sanguíneas se realizó mediante punción en los senos cervicales dorsales. Usamos una aguja de 21G x 1 1/2" (0.8 x 40mm), unida a una jeringuilla estéril de 5 ml y se extrajeron 5 ml de sangre por ejemplar y toma (Fig.3). Después de la extracción se presionó la zona afectada para evitar la formación de hematomas, devolviendo a la tortuga a su tanque al cabo de unos minutos. (Owens y Ruiz, 1980)

Fig 3: Extracción de muestra de sangre mediante técnica de punción en el seno cervical.

La sangre extraída fue alicuotada en tubos eppendorf de 2 ml previamente tratados con heparina de sodio. Tradicionalmente se utiliza EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para evitar la coagulación en sangre de reptiles, pero en algunas especies de tortugas puede causar lisis de los eritrocitos (Muro et al., 1998). La muestra fue trasladada a temperatura ambiente hasta el laboratorio y, una vez allí, medimos el porcentaje de hematocrito utilizando un hemocitómetro Hettich Zentrifugen modelo D7200 Tuttingen. Posteriormente se separó en plasma y hematocrito mediante centrifugación a 400 g, 5 min., en una centrífuga Beckman Coulter modelo Allegra 25R, y ambas fracciones se conservaron a –80ºC hasta la realización de los ensayos enzimáticos.

TORTUGA	INGRESO	SALIDA	VOL. EXTRACCIÓN (ml)
3291	--	8.08.14	5
3456	--	25.08.14	5
3457	--	25.08.14	5
3565	--	5.11.14	5
3605	--	5.11.14	5
3410	11.08.14	21.08.14	5
3426	14.08.14	27.08.14	5
3340	28.07.14	1.09.14	5
3432	20.08.14	1.09.14	5
3433	20.08.14	1.09.14	5
3447	20.08.14	1.09.14	5
3405	8.08.14	21.08.14	5

Tabla 3: Resumen de las extracciones realizadas a los ejemplares del estudio y volumen medio de sangre extraída.

3. Ensayos enzimáticos

3.1 Determinación de la actividad SOD.

Para determinar la actividad SOD se utilizó una adaptación del método de Marklund y Marklund (1974), un método rápido y con un alto grado de reproducibilidad que además requiere poca cantidad de muestra para la cuantificación de la actividad enzimática.

Esta técnica está basada en la autooxidación del pirogalol (1,2,3-bencenotriol o ácido pirogálico), compuesto que en soluciones alcalinas se autooxida rápidamente generando radicales superóxido en el medio, que a su vez aceleran la autooxidación del pirogalol (Boeringuer Mahnhein, 1988). Cuando el radical superóxido se acumula y se produce la autooxidación del pirogalol, éste da lugar a un compuesto pardo-amarillento, llamado purpurogalina, con un máximo de absorbancia de luz visible a 420 nm de longitud de onda (λ) y de coeficiente de extinción molar 2640 $M^{-1}cm^{-1}$. Si hay SOD presente en el medio, la enzima compite con el pirogalol por el radical superóxido, inhibiéndose la reacción de autooxidación, lo que da como resultado menor formación de purpurogalina. La formación de purpurogalina es susceptible de ser medida espectrofotométricamente en el tiempo, con lo que se puede

aprovechar el fenómeno para cuantificar la actividad SOD de una muestra problema midiendo la inhibición de la autooxidación del pirogalol respecto de un control (Fig. 4).

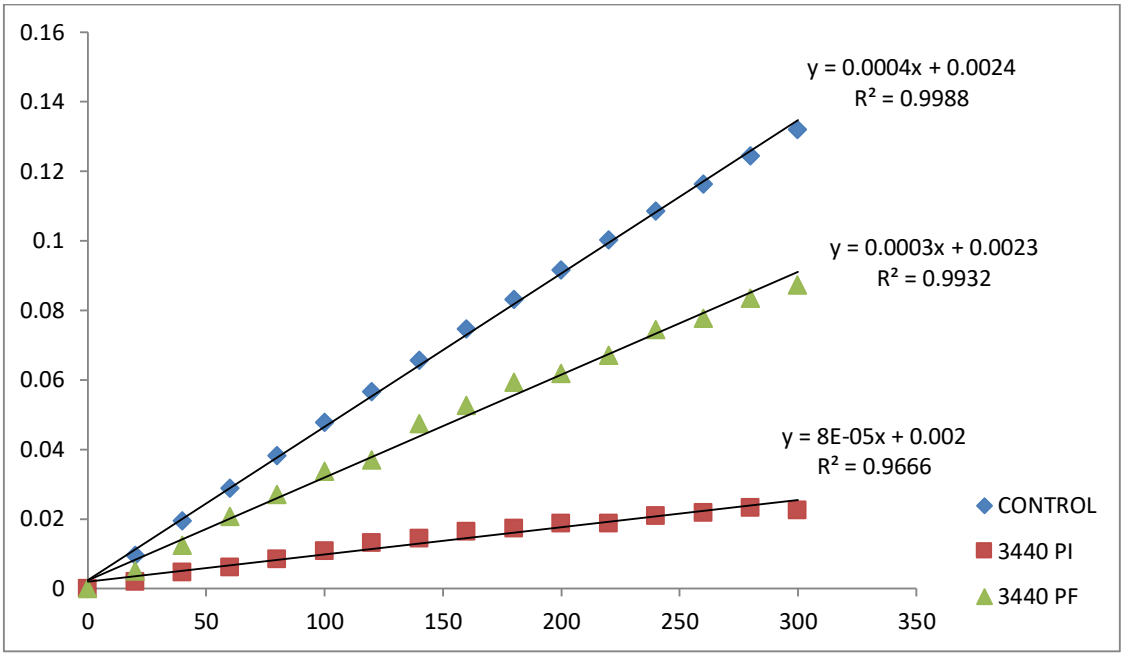


Fig 4: Medición de la actividad SOD en una muestra de plasma de entrada (rojo) y salida (verde). Se puede observar una disminución de la absorbancia con respecto al control (azul).

3.1.1 Puesta a punto del ensayo.

Partiendo de las condiciones experimentales empleadas en el Laboratorio de Fisiología y Biofísica de Membranas (FISBIOMEMB), Universidad de La Laguna, para la determinación de actividad SOD en sangre de rata (*Rattus norvegicus* var. Sprague Dawley), se procedió a ajustar los parámetros de la técnica para la medición en las fracciones hematocrito y plasma de *C. caretta*. La longitud de onda para las mediciones en hematocrito hubo de ser desplazada a 400 nm debido a que dicha fracción presenta un pico máximo de absorción en el visible a 420 nm, coincidente con la λ a la que se pretendía realizar el ensayo (Fig.5). En cambio, no fue necesario hacer modificaciones de la longitud de onda para la fracción de plasma.

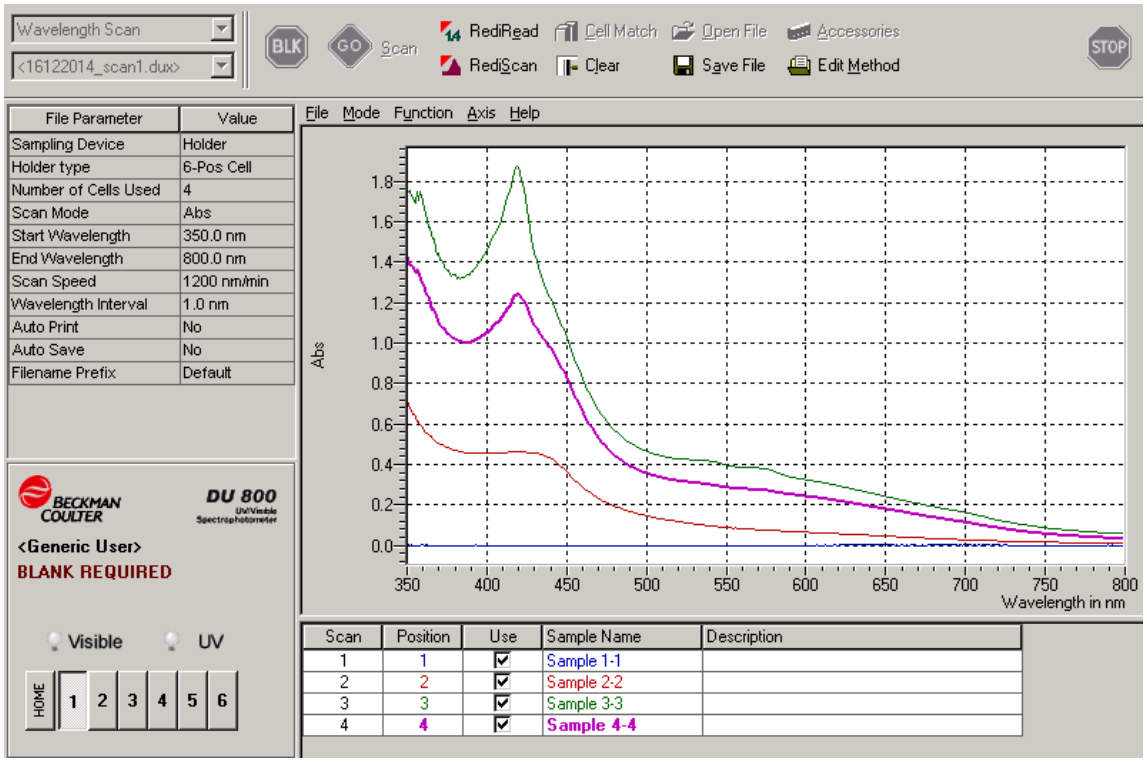


Fig 5: Espectros de absorción de la purpurogalina (rojo) y del hematocrito de sangre de *C. caretta* (verde y violeta) a diferentes concetraciones. El pico máximo de absorbancia del hematocrito (λ = 420 nm) coincide con el máximo de absorbancia para la purpurogalina.

3.1.2 Ensayo de actividad SOD.

Tras la puesta a punto de las condiciones para determinar la actividad enzimática de SOD en las fracciones de sangre de tortuga boba, el ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro Beckman Coulter modelo DU800. Para un total de 1 ml de reacción utilizamos 900 µl de buffer de reacción Tris–Ácido Cacodílico 50 mM, DTPA 1 mM, pH 8.2, a 26ºC, λ = 420 nm para plasma y λ = 400 nm para la fracción hematocrito, un volumen de muestra de 100 µl que fue sustituido en las cubetas de blanco y control por el mismo volumen de buffer de homogenización (Tris-HCl 20 mM, Complete 1x, pH 7.4), y 10 µl de pirogalol 30 mM para una concentración final de 300 µM.

El inicio de la reacción viene marcado por la adición de pirogalol, que siempre se hace en última instancia, y los cambios de absorbancia se midieron a las respectivas longitudes de onda para plasma y hematocrito durante 5 minutos a intervalos de 20 segundos.

La actividad específica de SOD se expresó en U/mg proteína (unidades de actividad enzimática), lo que se define como la cantidad de enzima necesaria para obtener el 50% de inhibición de autooxidación del pirogalol.

3.2 Ensayo enzimático de la actividad CAT.

Para la medida de la actividad CAT utilizamos el método descrito por Claiborne (Claiborne et al. 1985), basado en la capacidad de la enzima para reducir H_2O_2 a O_2 y agua.

La catálisis enzimática del H_2O_2 se puede medir espectrofotométricamente observando los cambios de absorbancia respecto al tiempo a λ = 240 nm (Fig. 6).

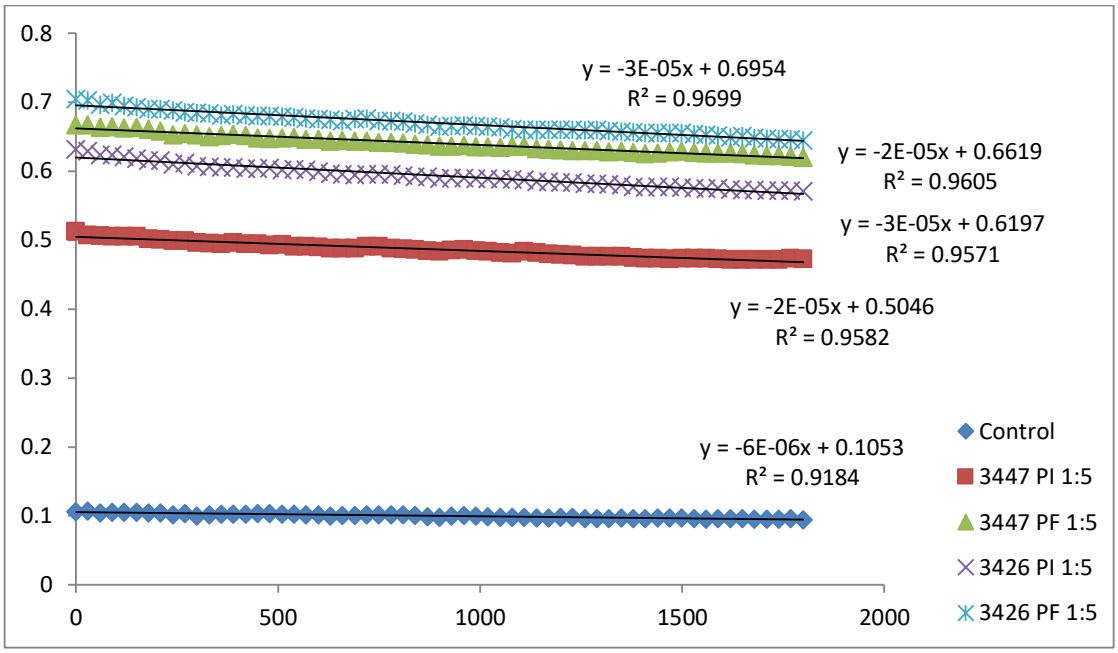


Fig 6: Medición de actividad catalasa para dos muestras de plasma de entrada (rojo y violeta) y salida (verde y celeste), donde se puede observar una variación de la absorbancia con respecto al control (azul).

Para un volumen total de reacción de 2 ml utilizamos 1879,4 µl de buffer de reacción 10 mM KH2PO4 – 10mM K2HPO4, pH 7.0, 20.6 µl de peróxido de hidrógeno 5 mM y 100 µl de muestra. En las cubetas blanco y control se sustituyó la muestra por buffer de homogenización Tris-HCl 20 mM, Complete 1x, pH 7.4. En la cubeta del blanco se sustituyó además el peróxido de hidrógeno por 20.6 µl agua milli-Q.

El inicio de reacción viene marcado por la adición del peróxido de hidrógeno, que siempre se hace en última instancia, y los cambios de absorbancia se midieron a λ = 240 nm durante 30 minutos a intervalos de 20 segundos, a una temperatura de 26ºC y en cubetas de cuarzo en un espectrofotómetro Beckman Coulter modelo DU800.

Se utilizó un coeficiente de extinción molar para el peróxido de hidrógeno de 42,6 $M^{-1}cm^{-1}$. La actividad específica de la enzima se expresó en µmol/min•mg de proteína.

3.3 Ensayo enzimático de la actividad GST.

La actividad GST fue determinada utilizando el método Habdous (Habdous et al., 2002) donde se utilizan 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) y glutatión reducido (GSH), como sustratos. Este ensayo está basado en el mecanismo de conjugación de CDNB con GSH, para formar el 1-(S-glutationil)2-4-dinitrobenceno, con un complejo de Mesenheimer intermedio que presenta un máximo de absorbancia a λ = 340nm.

La presencia de la enzima GST provoca un aumento en la formación de producto pudiéndose medir los cambios de absorbancia por aparición del complejo intermedio para establecer la actividad enzimática (Fig. 7).

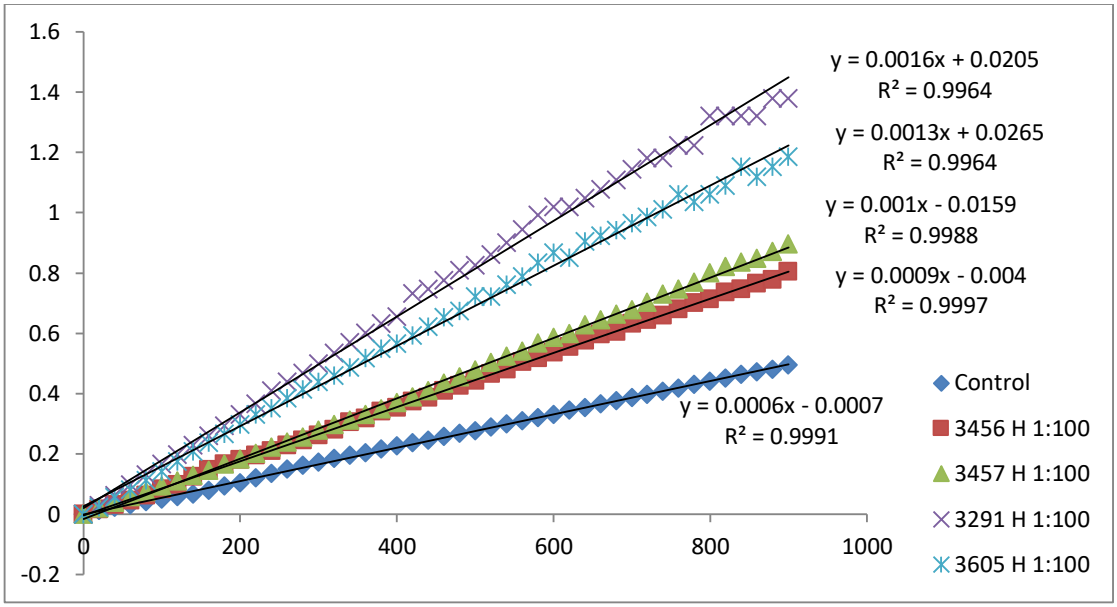


Fig 7: Medición de actividad GST para cuatro muestras de hematocrito de animales control (rojo, verde, violeta y celeste), donde se puede observar una variación de la absorbancia con respecto al control (azul).

Para un volumen total de reacción de 2 mL utilizamos 1820 µl de buffer de reacción fosfato HNa_2PO_4 100 mM, pH 6.5, 100 µl de GSH 5 mM, 40 µl de CDNB 1 mM y 100 µl de muestra. En las cubetas de blanco y control se sustituyó la muestra por buffer de homogenización Tris-HCl 20 mM, Complete 1x, pH 7.4, y, además, en la cubeta del blanco se sustituyó el CDNB por etanol absoluto.

La reacción se inició al añadir el CDNB y los cambios de absorbancia se midieron a λ = 340 nm, durante 15 minutos a intervalos de 20 segundos y a una temperatura de 26ºC en un espectrofotómetro Beckman Coulter modelo DU800.

Se utilizó un coeficiente de extinción molar de 9,6 $mM^{-1}cm^{-1}$ para el complejo de Mesenheimer. La actividad específica de la enzima se expresó en µmol/min•mg de proteína.

4. Determinación de la cantidad de proteína por muestra.

Para poder normalizar las actividades enzimáticas a miligramo de proteína, se determinó el contenido de proteína de las muestras utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina de suero bovino como proteína estándar para construir la recta patrón.

5. Análisis de datos.

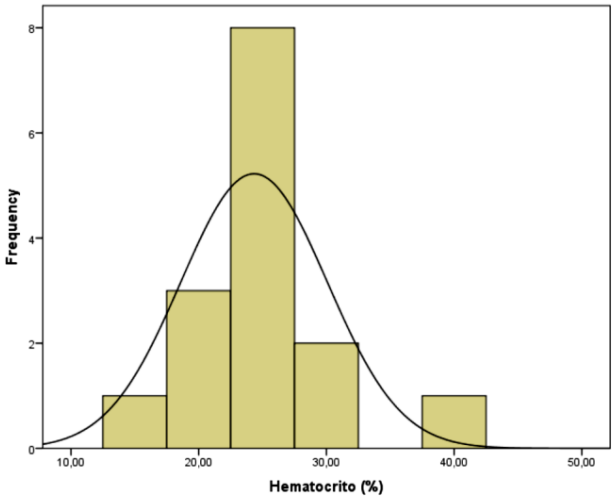
El software utilizado para llevar a cabo los análisis fue el paquete estadístico SPSS versión 20. Los datos fueros analizados mediante ANOVA de un factor, test de Levene y test de Kolmogorov-Smirnov, seguido de un *t*-Student o un test de Willcoxon en función de si los datos eran normales y homocedásticos. Los datos de hematocrito, al estar expresados en porcentaje fueron transformados a arcosenos del valor dividido entre 100. Las diferencias se consideraron significativas si el valor de *p* era menor que 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer objetivo de este trabajo, nos hemos planteado la caracterización de distintos parámetros relacionados con el estatus hemático y de defensa antioxidante en tortugas control, diagnosticadas como clínicamente sanas por el personal del CRFS "La Tahonilla", con el objeto de determinar los rangos basales en los que se sitúan los parámetros fisiológicos y bioquímicos que se evaluarán en el segundo objetivo.

1. Animales controles.

1.1 Hematocrito (HTC) en sangre.



Los valores de hematocrito observados en los animales control, presentaron una distribución normal (Fig. 8).

El valor medio obtenido fue de 24,33% ± 1,48%, siendo el valor mínimo observado de un 15% y el valor máximo de un 38% (Tabla 4).

e Hematocrito

Estadística descriptiva

	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
HTC	15	15,00	38,00	24,3333	1,47895	5,72796
Valid N (listwise)	15					

Tabla 4: Valores obtenidos de los resultados del análisis descriptivo del porcentaje de hematocrito en sangre.

Los valores obtenidos en este estudio se encuentran dentro de los rangos normales determinados en reptiles (15-55%), según ha sido revisado en Martínez-Silvestre et al. (2011). Dentro del grupo de los testudínidos, y en particular dentro de la famila *Quelonidae*, se han observado

rangos de hematocrito del 27-44% para ejemplares de tortuga boba (*Caretta caretta*), 27- 48% para tortuga carey (*Eretmochelys. imbricata)*, 23- 40% para tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea)*, y de 21-38% para tortuga verde (*Chelonia mydas)*. A pesar del amplio rango de HTC dentro de cada especie, éstos se consideran normales para ejemplares clínicamente saludables (Montilla et al., 2014). No obstante, es digno de mención el hecho de que los valores máximos obtenidos en nuestros ejemplares, aunque se sitúan dentro de los rangos establecidos para la especie, son claramente inferiores respecto a los observados para la familia *Quelonidae* (Montilla et al., 2014). Una explicación plausible para esta observación es que este efecto podría deberse a su estancia en el CRFS. En este centro, los animales se mantienen en tanques individuales con menos de un metro de agua de profundidad y son alimentados artificialmente, por lo que no necesitan realizar buceo para la búsqueda de alimento. Al no bucear, se produciría una adaptación hematopoyética compensatoria que llevaría a la reducción de los valores del HTC para disminuir la viscosidad sanguínea y consecuentemente el trabajo cardiaco. La ventaja fisiológica de esta adaptación es que ello redundaría en una reducción del gasto metabólico asociado a la función cardiaca. Esta hipótesis será evaluada mediante el análisis de muestras procedentes de tortugas salvajes (no varadas o enmalladas) en poblaciones estables del medio natural.

1.2. Medición de proteína en muestras de animales control.

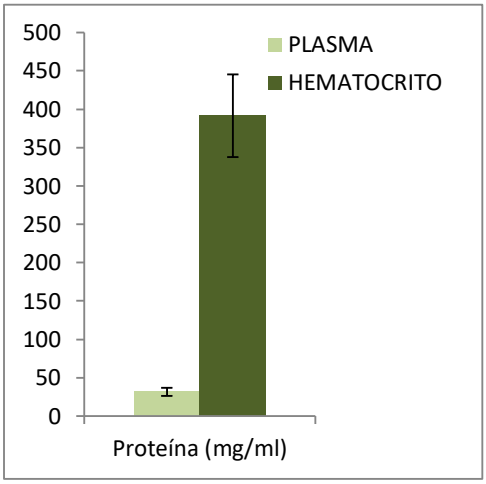


Fig 9: Contenidos de proteína entre el plasma y el hematocrito de los animales control. (**$p < 0,01$)

Los valores medios de la cantidad de proteína fueron de 31,53 mg/ml ±5.27 para el plasma y de 391,544 mg/ml ±53.89 para el hematocrito. Como era de esperar, se observaron diferencias significativas entre la cantidad de proteína existente en el plasma y en el hematocrito ($p<0,01$). Así pues, la cantidad de proteína del hematocrito fue más de un orden de magnitud superior a la del plasma, lo que concuerda con los datos de la mayoría de los vertebrados. Una buena parte de esta diferencia se debe a la presencia de hemoglobina corpuscular. Nuestra estimación a partir de los datos de la Figura 9 es que el contenido de hemoglobina rondaría los 3,6 g/dl, que estaría dentro del rango (por debajo de 10 g/dl) descrito para reptiles (Martínez-Silvestre et al., 2011).

1.3. SOD extracelular (SOD EC) y SOD intracelular (SOD HTC)

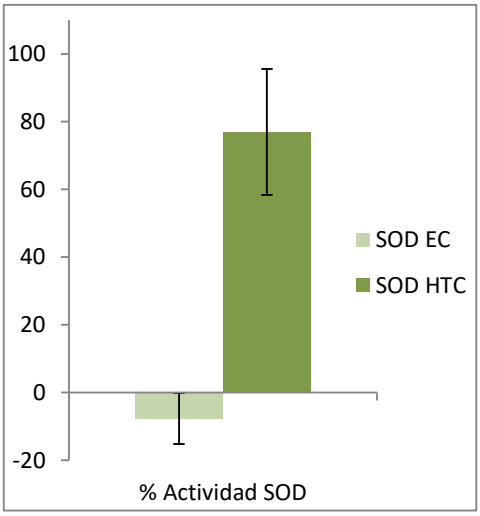


Fig 10: Actividad SOD (U/mg proteína) medido en animales control. (***p< 0,005)

La SOD es una de las enzimas que están en la primera línea de defensa ante los daños que puede producir el estrés oxidativo. En el presente trabajo, las actividades superóxido dismutasa de las dos isoformas intracelulares (SOD1 y SOD2) se han determinado conjuntamente y designado como SOD HTC. Si bien todas las isoformas catalizan la misma reacción, diversos estudios han mostrado que la SOD EC es una enzima inducible y presenta más actividad cuando el organismo está sometido a estresores externos que derivan en la producción de ROS (Marklund, 1984), mientras que las actividades de las SOD intracelulares, están más especializadas en tamponar la generación de radicales superóxido generados como consecuencia del metabolismo aeróbico (Wiseman y Halliwell, 1996).

Los resultados de nuestro estudio han demostrado que, en los animales control, la actividad SOD EC fue de -5,93 ± 3.260 U/mg proteína, resultando estadísticamente indistinguible de 0, mientras que la actividad SOD HTC fue de 76,984 ±18,608 U/mg proteína, valores significativamente mayores que los de la SOD EC en los mismos animales (Fig. 10).

Los rangos de variación de la actividad SOD de origen extracelular oscilaron entre -7,62 U/mg proteína y 5,16 U/mg proteína, mientras que los de la SOD intracelular variaron desde 26,97 U/mg proteína hasta 118,44 U/mg proteína (Tabla 5).

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
SOD_EC_control	4	-7,62	5,16	-,5933	6,52191

SOD_HTC_control	5	26,97	118,44	76,9838	41,60980
N válido (según lista)	4				

Tabla 5: Resultados del análisis descriptivo de la actividad SOD en ejemplares control.

Estos datos indican que en las condiciones controles consideradas en este estudio, en las que los animales estaban próximos a su liberación al medio natural y diagnosticados como clínicamente sanos, el hecho de que no se detecte actividad SOD EC indica que los ejemplares no se encontraban bajo la influencia de estresores ambientales, y confirma el hecho de que esta actividad SOD EC podría ser un biomarcador de estrés en tortugas. Por otro lado, como se comentó anteriormente, los valores de la SOD HTC fueron significativamente mayores que los de la SOD EC y distintos de 0 (p>0.005), lo que resulta coherente desde el punto de vista fisiológico dado que las mitocondrias son la principal fuente de generación intracelular de especies reactivas del oxígeno, procedentes de la respiración celular (Wiseman y Halliwell, 1996).

1.4. CAT extracelular (CAT EC) y CAT intracelular (CAT HTC)

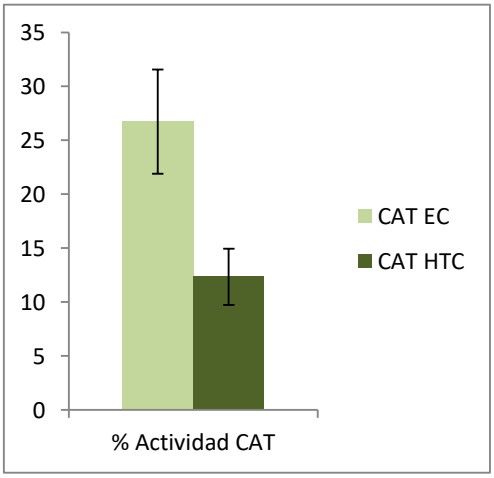


Fig 11: Actividad CAT (µmol/min·mg proteína) medido en animales control. (***p< 0,005)

La enzima catalasa (CAT), perteneciente al sistema antioxidante clásico, se encuentra también en la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo ya que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno se genera, entre otros procesos fisiológicos, en 1) la reacción de dismutación del anión superóxido catalizado por SOD, 2) directamente durante el metabolismo mitocondrial de respiración celular, 3) como mediadores de señalización celular dentro del sistema inmune y tejidos vasculares (Seifried et al., 2007).

Las actividades CAT determinadas en los individuos control arrojaron valores de 26,734 ±4,833 µmol/min•mg proteína en plasma (CAT EC) y de 12,340 ±2,608 µmol/min•mg en hematocrito (CAT HTC) (Fig. 11). Los rangos de variación de la actividad CAT EC estuvieron entre 17,66 µmol/min•mg proteína y 44,83 µmol/min•mg proteína, mientras que los de la CAT HTC variaron desde 7,17 µmol/min•mg proteína hasta 19,48 µmol/min•mg proteína (Tabla 6). Los resultados del análisis estadístico mostraron que los valores de actividad CAT EC fueron significativamente superiores a la de CAT HTC ($p<0.005$).

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
CAT_EC_control	5	17,66	44,83	26,7336	10,80788
CAT_HTC_control	4	7,17	19,48	12,3398	5,21609
N válido (según lista)	4				

Tabla 6: Resultados del análisis descriptivo de la actividad CAT en ejemplares control.

A pesar de la búsqueda exhaustiva de datos comparativos de actividad catalasa en especies de quelonios, nuestros valores de animales controles parecen ser los primeros que se han obtenido en plasma y hematocrito. No obstante, hay que indicar que la actividad catalasa sí ha sido determinada en distintos órganos de diferentes especies de tortugas en condiciones basales y bajo condiciones de contaminación ambiental (Labrada-Martagón et al., 2011; Valdivia et al., 2007). Es interesante el hecho de que las actividades observadas en este estudio son comparables a las observadas en músculo esquelético, pulmón y corazón de tortuga verde (*Chelonia mydas*) bajo condiciones de estrés oxidativo basal (Valdivia et al., 2007). En cualquier caso, los datos indican que el plasma de *C. Caretta* está equipado de la maquinaria bioquímica capaz de neutralizar la acumulación de peróxido de hidrógeno y, consecuentemente, protegerse de las potenciales agresiones oxidativas generadas por contaminantes pro-oxidantes.

1.5. GST extracelular (GST EC) y GST intracelular (GST HTC)

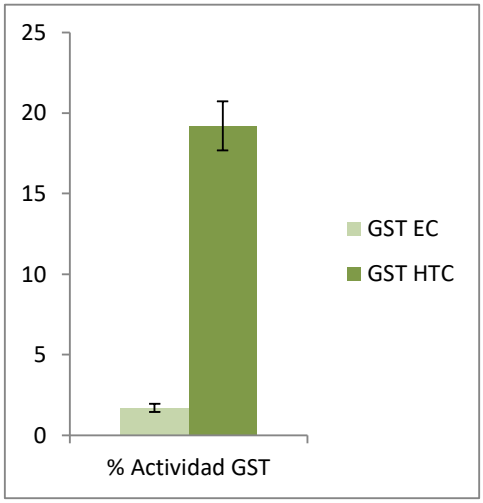


Fig 12: Actividad GST (µmol/min·mg proteína) medida en animales control. (***p< 0,005)

La GST está englobada dentro del grupo de enzimas consideradas detoxificantes de fase II. Esta enzima actúa en la detoxificación de electrófilos tanto exógenos como endógenos que son productos de diferentes tipos de estrés oxidativo (Blanchette et al., 2007), incluyendo el causado por exposición a contaminantes, pesticidas, y metales pesados, provenientes de la contaminación ambiental, los cuales son acumulados en el organismo y disparan respuestas de estrés oxidativo (Stegeman et al., 1992; Watanabe et al., 2002).

Las actividades medidas en plasma (GST EC) y fracción hematocrito (GST HTC) de los individuos control arrojaron valores de 1,704 ±0,254 µmol/min•mg proteína para la GST EC, que fue significativamente distinta de 0 (p<0.05), y de 19,208 ±1,523 µmol/min•mg para la GST HTC (Fig. 12). Estos resultados indican que los animales control exhiben niveles significativamente mayores de actividad GST en la fracción celular sanguínea que en el plasma (p<0.005).

Los rangos de variación de la actividad GST EC oscilaron desde 1,07 µmol/min•mg proteína hasta 2,34 µmol/min•mg proteína, mientras que los de la GST Htc lo hicieron entre 14,90 µmol/min•mg proteína y 23,53 µmol/min•mg proteína (Tabla 7).

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
GST_EC_control	5	1,07	2,34	1,7042	0,56767
GST_HTC_control	5	14,90	23,53	19,2076	3,40521
N válido (según lista)	5				

Tabla7: Resultados del análisis descriptivo de la actividad GST en ejemplares control.

Podemos observar que aunque la actividad GST en plasma es más de un orden de magnitud inferior que la del hematocrito, existe una capacidad basal detoxificante intrínseca en la fracción

plasmática. Dado que en la mayoría de las especies estudiadas la actividad GST es inducible, esto es, modulada por las agresiones pro-oxidantes y pro-inflamatorias de diversos contaminantes (Higgins et al., 2011; Daniel, 1993), podemos concluir que las tortugas control presentan un buen estado de salud, al menos en lo que se refiere al estrés oxidativo y a la presencia de estresores ambientales. Finalmente, es de destacar el hecho de que estos datos están en línea con los observados anteriormente para la SOD extracelular (Tabla 5, Fig. 10).

2. Adaptaciones en el proceso de recuperación.

Una vez analizadas las características de los distintos parámetros fisiológicos y bioquímicos en condiciones control, en este objetivo se procederá a la evaluación de los cambios en los mismos en animales varados y tratados en el centro de recuperación en el momento del ingreso y justo antes de su devolución al medio.

2.1 Hematocrito.

Como se ha mencionado, las tortugas marinas utilizadas en este estudio han estado un tiempo indefinido enmalladas en artes de pesca hasta que han sido recuperadas y llevadas al CRFS. Esto conlleva varias consecuencias, la más destacada es que los animales han estado sometidos presumiblemente a un estado de hipoxia crónico debido a que al estar enredadas y no poder salir a respirar con regularidad a la superficie y estuvieron sometidas a una ventilación deficiente. A este factor de estrés hay que añadir que, en estas condiciones, los animales habrían padecido condiciones de inanición y probablemente deshidratación.

Los porcentajes de hematocrito determinados fueron de 29,286 ±3,307 para los individuos a su entrada al CRFS y de 24,429±2,581 para los individuos a su salida del centro (Fig. 13A). Estas diferencias de medianas entrada-salida fueron muy significativas ($p<0.005$). Respecto a los rangos de variación, los animales mostraron un valor mínimo de 19% y un máximo del 44% de HTC a la entrada y de 15% (mínimo) a 34% (máximo) a su salida del CRFS. Las diferencias entrada-salida para cada individuo se muestran en la figura 13B. Puede observarse que, sin excepciones, todos los ejemplares mostraron el mismo comportamiento: el %HTC disminuyó durante la recuperación en el centro.

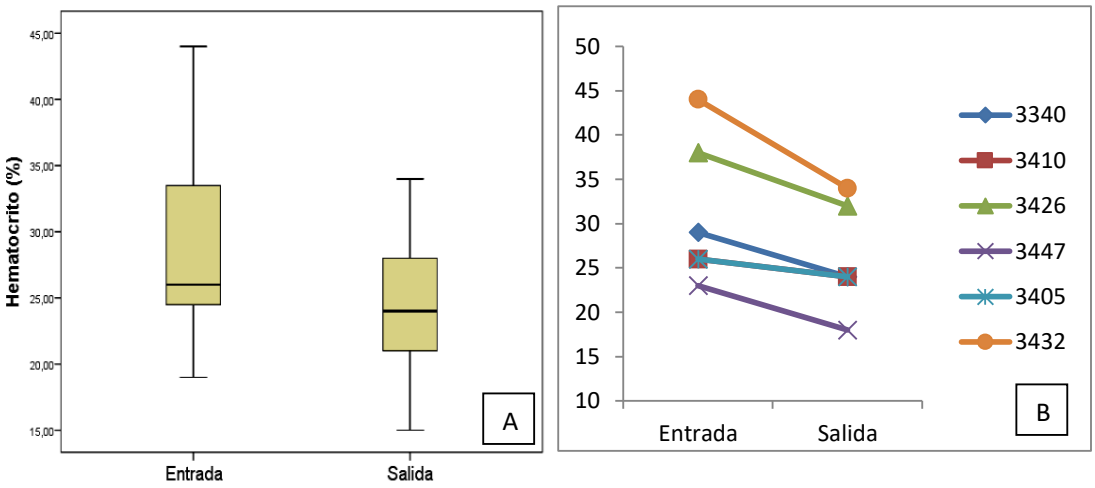


Fig 13: A) Diagramas de caja del porcentaje de hematocrito en sangre medido en animales a la entrada y salida del CRFS. B) : Porcentaje de HCT de cada uno de los individuos a la entrada y a la salida del centro.

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Entrada	7	19,00	44,00	29,2857	3,30738	8,75051
Salida	7	15,00	34,00	24,4286	2,58067	6,82781
Valid N (listwise)	7					

Tabla 8: Estadística descriptiva del % HTC en ejemplares de *C. Caretta* a la entrada y a la salida del centro.

La interpretación de estos resultados es que la disminución del %HTC a la salida del centro se debe a que mientras duró su estancia en el mismo los animales recuperaron una ventilación normal, por lo que al aumentar los niveles de oxígeno en sangre disminuyó el estrés hipóxico y consecuentemente la producción de la hormona eritropoyetina (activada por el descenso del nivel de O_2 en sangre), que como se sabe estimula la médula ósea incrementando la eritropoyesis o producción de eritrocitos (Hill y Wyse, 2013). Al aumentar la PO_2 sanguínea y disminuir la producción de esta hormona los niveles de hematocrito volvieron a la normalidad.

Otra observación interesante es que existe una relación hiperbólica entre los niveles de hematocrito a la entrada y salida del centro (Fig. 14). Esta observación tiene un sentido fisiológico especial ya que un aumento del hematocrito tiene como consecuencia un aumento en la viscosidad sanguínea y un incremento del trabajo cardíaco al tener el corazón que mover un fluido más viscoso.

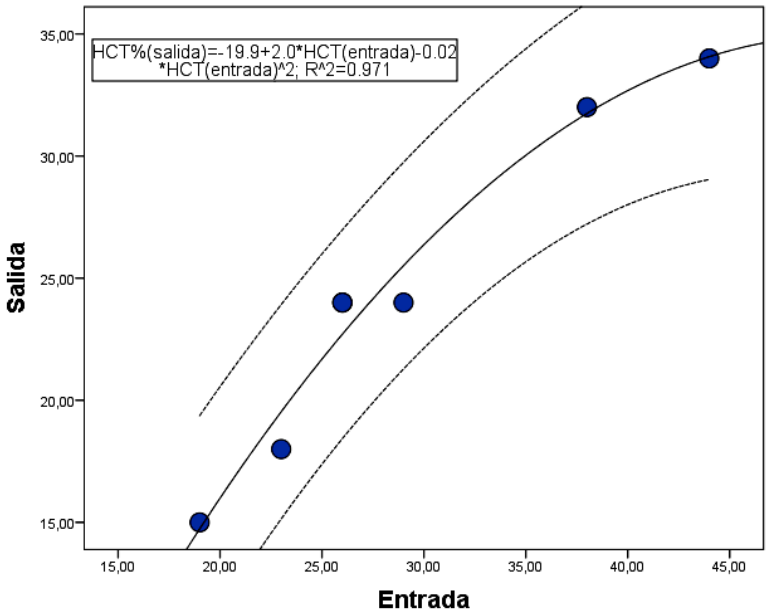


Fig 14: Relaciones entre el %HCT en los animales a la entrada y salida del CRFS.

2.2 Actividad antioxidante.

2.2.1 Superóxido dismutasa.

Tal como se observó anteriormente, la actividad SOD EC fue significativamente menor que la actividad SOD HTC (p<0,001). Sin embargo, a diferencia de los controles, la actividad SOD extracelular fue estadísticamente mayor que 0 (p<0.05). Por ello se analizó su comportamiento en los animales recuperados. (Tabla 9).

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
SOD_EC	11	,98	37,65	14,1322	11,67247
SOD_HTC	13	7,87	231,96	133,2511	67,25377
N válido (según lista)	10				

Tabla 9: Análisis descriptivo del porcentaje de actividad SOD EC y SOD HTC en ejemplares a la entrada y a salida del centro

2.2.2 Superóxido dismutasa extracelular (SOD EC).

Las actividades SOD EC estudiadas, expresadas en porcentaje frente al valor medio del control, dieron valores de 100% ±31,444% para los animales de entrada y de 17,384%± 16,251% para los animales de salida, resultando en una disminución significativa entre la muestras colectadas a la entrada y salida de los animales (p<0,05) (Fig. 15). La interpretación de estas observaciones es que la permanencia de los ejemplares en la situación de enmalle hizo que su ventilación fuera ineficiente y que entrasen en un estado de hipoxia crónica y prolongada, lo que activó su metabolismo anaeróbico y el acceso ocasional al aire atmosférico provocó estrés generando grandes cantidades de ROS. Una vez que el animal ha sido liberado del agente estresor y vuelve a un estado de ventilación normal en el centro, y por tanto a un metabolismo aeróbico basal, los niveles de ROS habrían disminuido y con ello los estímulos para activar la expresión de SOD EC.

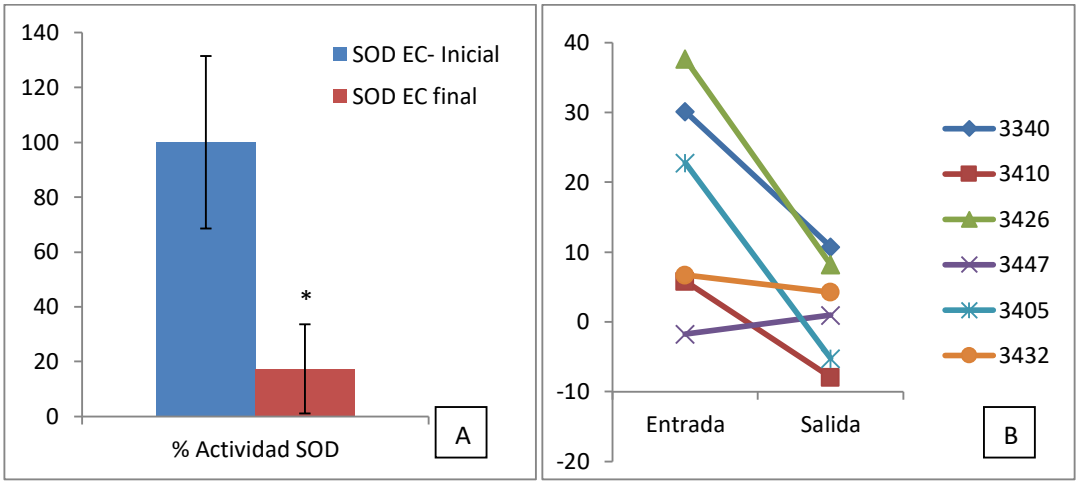


Fig 15: A) Variación del porcentaje de actividad SOD EC a la entrada y a la salida del centro. B): Variación de actividad SOD EC (U/mg proteína) medida por individuo a la entrada y a la salida del centro. (* p>0,05)

2.2.3 Superóxido dismutasa intracelular (SOD HTC).

A diferencia de la SOD EC, las actividades SOD HTC estudiadas no mostraron diferencias significativas entre las muestras de entrada y las de salida (p=0,893). Los valores registrados fueron de 100% ±24,345 % para los animales de entrada y de 96,424%± 24,192% para los animales de salida (Fig. 16).

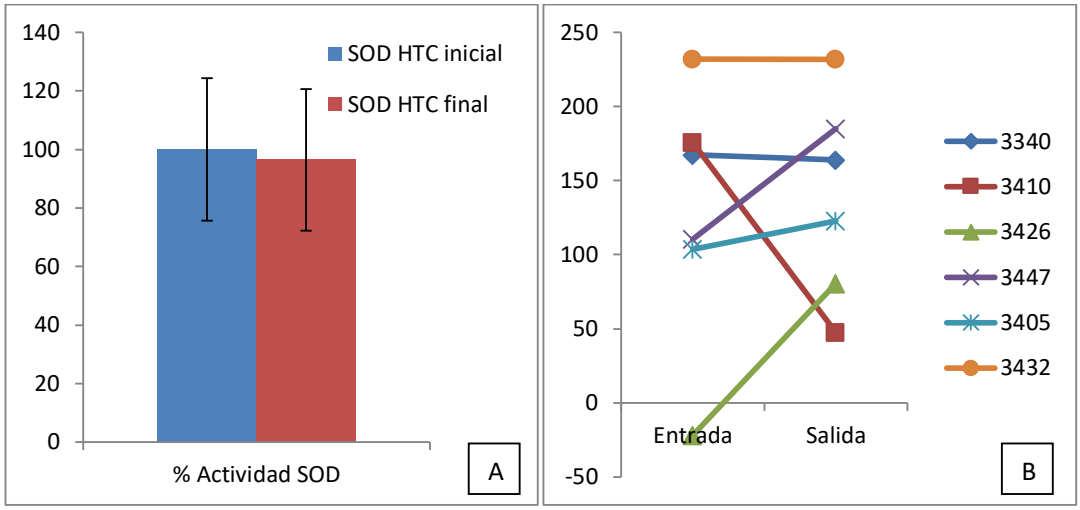


Fig 16: A) Porcentaje de actividad SOD HTC medida a la entrada y a la salida del centro. B) Variación individual de actividad SOD HTC (U/mg proteína) medida a la entrada y a la salida del centro.

2.2.4 Catalasa.

La actividad catalasa en las muestras de plasma y de hematocrito no pudieron medirse de manera fiable en los animales de entrada-salida al centro de recuperación. Esto fue debido a una avería en el equipo de medida que arrojaba medidas inconsistentes en el ultravioleta (que es la banda en la que se detecta la actividad catalasa), y que tardó tiempo en poder solucionarse. No obstante, disponemos de las muestras correspondientes, y es nuestra intención repetir estos experimentos en las próximas semanas.

2.3 Enzimas detoxificantes: GST.

2.3.1 GST extracelular (GST EC).

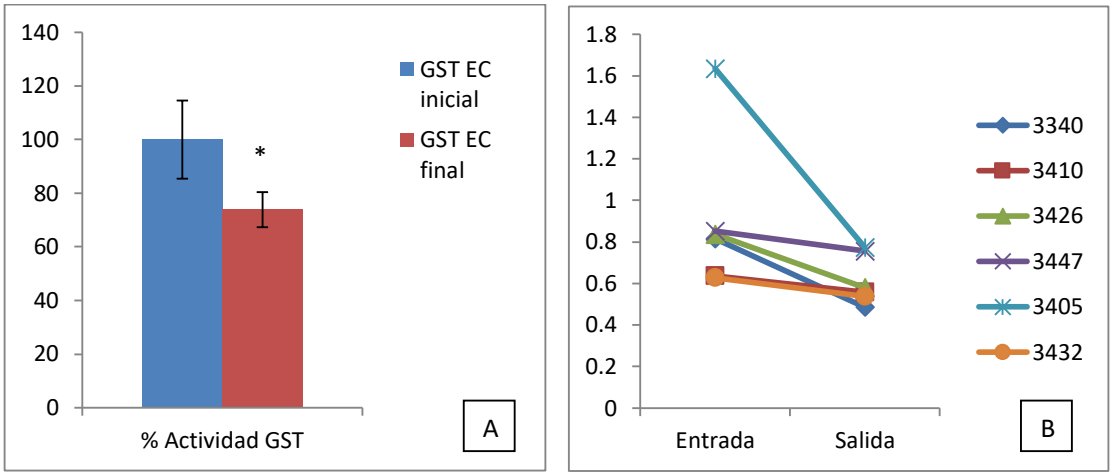


Fig 17: A) Variación del % de actividad GST EC medida a la entrada y a la salida del centro. B) Variación individual de la actividad GST EC (µmol/min·mg proteína) a la entrada y a salida del centro. (*p<0,05).

Los niveles de actividad enzimática de GST en plasma (GST EC), expresados en porcentaje, fueron de 100% ±14,575% en el momento de entrada al centro y de 73,869% ±6,545% en el momento de salida (Fig. 17A). El análisis estadístico de muestras apareadas demostró una disminución significativa de los niveles de actividad GST EC a la salida del centro (p<0,05). En la figura 17B, se muestran las variaciones individuales de las actividades de esta enzima en cada animal a la entrada y salida del centro, pudiéndose observar que, sin excepciones, todos los animales exhibieron una disminución de actividad GST EC a la salida del centro. Estas observaciones demuestran que los animales varados presentan un nivel de estrés oxidativo más o menos elevado que compensan aumentando la capacidad detoxificante. La recuperación de los mismos en el centro restaura los valores enzimáticos hasta los observados en animales controles (Fig. 12). Aunque no se puede asegurar cual es el tipo de estresor que causó la elevación de GST EC en los animales de entrada, es probable que ésta esté relacionada con la reperfusión sanguínea de tejidos con flujo sanguíneo restringido durante los periodos de hipoxia (fenómeno conocido como isquemia por hipoxia-reperfusión) cuando los animales recuperan una ventilación normal después de un periodo isquémico (Sadek et al., 2003; Das et al., 1995).

2.3.2 GST intracelular (GST HTC).

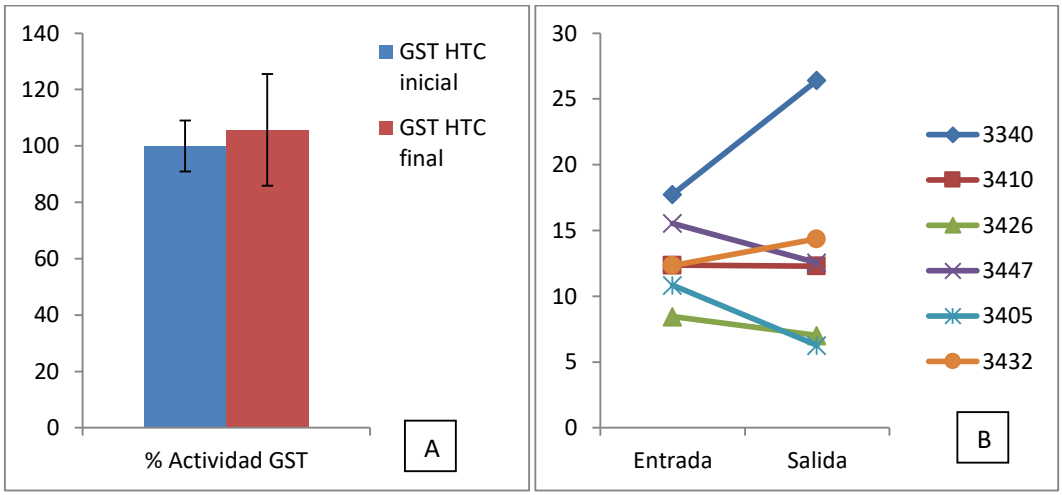


Fig 18: A) Variación del % de actividad GST HTC medida a la entrada y a la salida del centro. B) Variación individual de la actividad GST HTC (µmol/min·mg proteína) a la entrada y a salida del centro.

Los niveles de actividad enzimática de GST en hematocrito (GST HTC) expresados en porcentaje fueron de 100% ± 9,048% en el momento de entrada al centro y de 105,731% ±19,833% en el momento de salida. Los análisis estadísticos revelaron que no existen diferencias significativas entre las muestras de entrada y las muestras de salida (p=0,681) (Fig. 18A). El análisis individualizado mostrado en la Fig. 18B reveló que existe una importante heterogeneidad en el comportamiento de los distintos ejemplares, con algunos animales disminuyendo su actividad a la salida y otros elevándola. Estas variaciones requieren una comprobación adicional en ejemplares varados y recuperados para determinar el grado exacto de cambio en la actividad GST del hematocrito.

2.3.3. Medición de proteína en muestras de plasma y hematocrito de animales recuperados.

Una comprobación final realizada en este estudio, ha sido la cuantificación de los niveles de proteína del plasma y del hematocrito en los ejemplares a la entrada y a la salida del centro. Esto es necesario dado que la mayor parte de las actividades enzimáticas han sido normalizadas al contenido de proteínas y, por lo tanto, las variaciones detectadas en las actividades

enzimáticas a la entrada y salida de los animales podrían ser debidas a variaciones en el nivel de proteína de referencia.

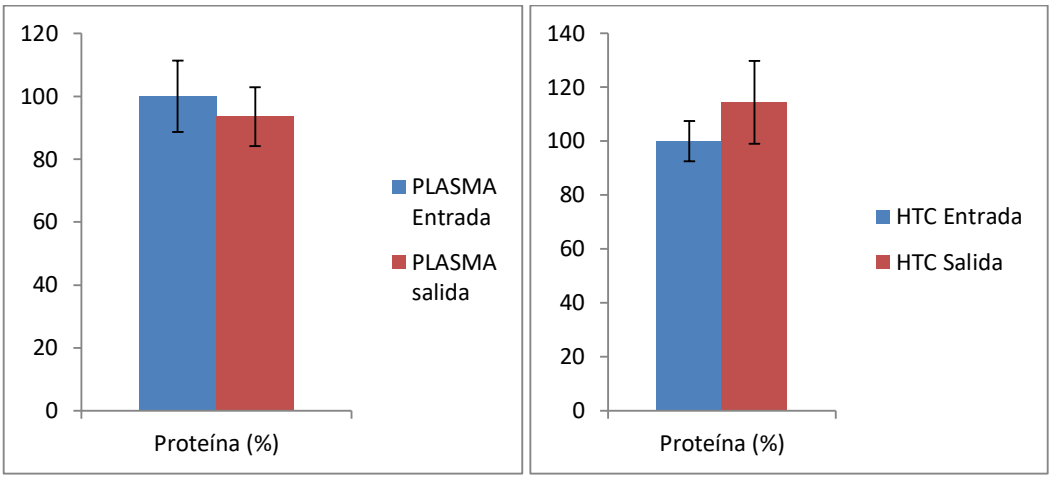


Fig 19:A) Variaciones del contenido de proteína en plasma (expresado como porcentaje de proteína a la entrada) en las muestras de entrada y de salida. B) Variaciones del contenido de proteína en hematocrito (expresado como porcentaje de proteína a la entrada) en las muestras de entrada y de salida.

La cantidad de proteína en las muestras de plasma y de hematocrito (Fig. 19), expresadas como porcentaje del contenido proteico a la entrada al centro, fueron de 100% ±11.35 y 100% ±7.47 para plasma y hematocrito respectivamente. Los valores a la salida fueron de 93.52% ±9.35 y 114%±15.36 para plasma y hematocrito respectivamente. Los análisis estadísticos revelaron que no existen diferencias significativas (p>0,05) en el contenido de proteínas, en ninguna de las dos fracciones, entre la entrada y la salida de los ejemplares. Por lo que podemos concluir que las variaciones detectadas en las actividades enzimáticas ensayadas se deben a variaciones en la cantidad y/o nivel de actividad de las enzimas analizadas.

CONCLUSIONES

1) Los parámetros hemáticos y de estrés oxidativo en el plasma y en la fracción del hematocrito que han sido determinados este estudio podrían ser utilizados como biomarcadores de diferentes tipos de estrés en *Caretta caretta*.
2) Las variaciones en los parámetros analizados en las tortugas varadas entre la entrada al centro de recuperación y su liberación al medio, demuestran que los animales varados sufren de un estrés oxidativo crónico, que puede ser revertido durante el periodo de recuperación.
3) De entre los distintos parámetros analizados, los valores del hematocrito y las actividades superóxido dismutasa extracelular (SOD EC) y glutatión-S-transferasa extracelular (GST EC), parecen ser los biomarcadores más sensibles a las condiciones de estrés en ejemplares de *C. caretta*.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Mario Díaz por haber creído en este proyecto y haber querido comenzarlo y tutorizarlo, aún cuando el tiempo y las obligaciones, le dijeran que no en un primer momento.

Al Dr. Tomás Gómez, por haber convencido a Mario para llevarlo a cabo.

A David Quinto, por haber dedicado horas y paciencia a enseñarle todos los entresijos del laboratorio a una bióloga de "bota" como yo, y por haber seguido de cerca los progresos y ayudar tanto, de manera desinteresada. Sin él no habría sido posible realizar este estudio.

Gracias al equipo del CRFS "La Tahonilla", por toda la dedicación para que mi periodo de prácticas fuese inolvidable, gracias en especial a Santiago Mayans y a Caloli Méndez, por creer en este estudio y por darme la posibilidad de conseguir las muestras para llevarlo a cabo.

A Fátima Mesa por compartir risas y ayuda, también desinteresada, y por contagiarme esa curiosidad insana por el estrés oxidativo. Quién lo diría…

Dar las gracias también a todos mis compañeros de fatigas de AdenAventura, que han seguido día a día conmigo, todo lo que he ido aprendiendo con este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA:

Bjorndal, K.A., Bolten, A.B. y Martins, H.R. 2000. Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles Caretta caretta: duration of pelagic stage. *Marine Ecology Progress Series*. 202:265-272. doi: 10.3354/meps202265

Blanchette, B., Feng, X. y Singh, B.R. 2007. Marine glutathione S-transferases. *Marine Biotechnology*. 9:513-542. doi: 10.1007/s10126-007-9034-0

Boerinnger Mahnheim. 1988. Manual de técnicas y datos de bioquímica. Barcelona, España.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Camiñas, J. A. 2004. Estatus y conservación de las tortugas marinas en España. *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Ed. Pleguezuelos, J. M., Márquez, R. y Lizana, M. Pp. 345-380. Madrid, España.

Chance, B. y maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in enzymology*. Ed. Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. Pp. 764-765. New York, USA.

Chance, B., Sies, H. y Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. 59:527-605.

Clairborne, A. 1985. Catalase activity. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Ed Greenwald, R.A. Pp. 283–284. Florida, USA.

Daniel, V. 1993. Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 28:173-207.

Das, D.K., Maulik, N. y Moraru, I.I. 1995. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 27:181-93. doi: 10.1016/S0022-2828(08)80017-X

Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S. y Siest, G. 2002. Rapid spectophotometric method for serum glutation S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*. 326:131-142. doi: 10.1016/S0009-8981(02)00329-7

Halliwell, B. 1982. Production of superoxide hydrogen peroxide and hydroxy radialcals by phagocytic cells, a cause of chronic inflamatory disease. *Cell Biology International Reports*. 6:529-542.

Hermes-Lima, M. y Storey, K.B. 1993. Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *American Journal of Physiology*. 265: R646–R652.

Higgins, L.G. y Hayes, J.D. 2011. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metabolism Reviews*. 43:92-137. doi: 10.3109/03602532.2011.567391

Keller, J.M., Kucklick, J.R. y McClellan-Green, P.D. 2004. Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtle blood: extraction techniques and distribution among plasma and red blood cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 46:254-264. doi: 10.1007/S00244-003-2262-Z

Lazar, B., Maslov, L., Romanic, S.H., Gracan, R., Krauthacker, B., Holcer, D. y Tvrtkovic, N. 2011. Accumulation of organochlorine contaminants in loggerhead sea turtles, Caretta caretta, from the eastern Adriatic Sea. *Chemosphere*. 82:121-129. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.015

Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*. 68:253–278. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001

Marco, A., Carreras, C. y Abella, E. 2009. Tortuga boba – Caretta caretta. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Ed. Salvador, A. y Marco, A. Madrid, España.

Marklund, S. y Marklund, G. 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47:469-474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x

Marklund, S. L. 1984. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cells lines. *The Journal of Clinical Investigation*. 74:1389-1403. doi: 10.1172/JCI111550

Mast, R.B. y Pritchard, P.C.H. 2006. The top ten burning issues in global sea turtle conservation. *State of the World's Sea Turtles*, vol I. Pp. 12-13. Washington , DC, USA.

Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C. y Rattner, B.A., 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. *Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Ed. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M. y Bergman, H.L. Pp. 5–85. Chelsea, England.

Monagas, P., Oros, J., Arana, J. y Gonzalez-Diaz, O.M. 2008. Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles (Caretta caretta) stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2011). *Marine Pollution Bulletin*. 56:1949-1952. doi: 10.7589/2012-03-093

Monzón-Arguello, C., Rico, C., Carreras, C., Calabuig, P., Marco, A. y López-Jurado, L. F. 2009. Variation in spatial distribution of juvenile loggerhead turtles in the eastern Atlantic and western Mediterranean Sea. Journal of Experimental. *Marine Biology and Ecology*. 373:79-86. doi: 10.1016/j.jembe.2009.03.007

Muro, J., Cuenca, R., Pastor, J., Vinas, L. y Lavin, S. 1998. Effects of lithium heparin andtripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's tortoises (Testudo hermanni). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 29:40-44.

Owens, D. y Ruiz, J.G. 1980. New methods of obtaining Blood and Cerebrospinal fluid from Marine Turtles. *Herpetologica*. 36:17-20.

Sadek, H.A., Nulton-Persson, A.C., Szweda, P.A. y Szweda, L.I. 2003. Cardiac ischemia/reperfusion, aging, and redox-dependent alterations in mitochondrial function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 420:201-208. doi: 10.1016/j.abb.2003.09.029

Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I. y Milner, J.A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 18:567-579. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.10.007

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. y Van Veld, P.A. 1992a. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. *Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Ed. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M. y Bergman, H.L. Pp. 235-335. Chelsea, England.

Stegeman, J.J., Brouwner, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992b. Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Ed. Hugget, R.J., Kimarle, R.A., Mehrle Jr., P.M. y Bergman, H.L. Pp. 272-315. Florida, USA.

Torrent, A., Gonzalez-Diaz, O.M., Monagas, P. y Oros, J. 2004. Tissue distribution of metals in loggerhead turtles (Caretta caretta) stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2011). *Marine Pollution Bulletin*. 49:854-860. doi: 10.7589/2012-03-093

Watanabe, I., Kunito, Tanabe, S., Amano, M. y Koyama, Y., 2002. Accumulation of heavy metals in Caspian seals (Phoca caspica). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 43:109-120. doi: 10.1007/s00244-001-0055-9

Willmore, W.G. y Storey, K.B. 1997a. Antioxidant systems and anoxia tolerance in freshwater turtle, Trachemys scripta elegans. Molecular and Cellular Biochemistry. 170:177-185. doi: 10.1023/A:1006817806010

Willmore,W.G. y Storey, K.B. 1997b. Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. *American Journal of Physiology*. 273:R219-R225.

Wiseman, H. y Halliwell, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role ininflammatory disease and progression to cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 313:17-29.